



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Medicina Social

Marcus Vinicius Gouvêa

Desenvolvimento e validação de modelo preditivo e avaliação de testes de diagnóstico por classe latente para o parasitismo por *L. chagasi* em cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário da UFPI, Teresina

Rio de Janeiro

2011

Marcus Vinicius Gouvêa

Desenvolvimento e validação de modelo preditivo e avaliação de testes de diagnóstico por classe latente para o parasitismo por *L. chagasi* em cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário da UFPI, Teresina

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Epidemiologia.

Orientador: Prof Dr. Guilherme Loureiro Werneck

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBC

G719 Gouvêa, Marcus Vinicius.

Desenvolvimento e validação de modelo preditivo e avaliação de testes de diagnóstico por classe latente para o parasitismo por *L. chagasi* em cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário da UFPI, Teresina / Marcus Vinicius Gouvêa. – 2011.

87f.

Orientador: Guilherme Loureiro Werneck.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Medicina Social.

1. Leishmaniose visceral – Teses. 2. Leishmaniose visceral – Diagnóstico – Teses. 3. Cão – Doenças – Teses. 4. Parasitologia veterinária – Teses. I. Werneck, Guilherme Loureiro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Medicina Social. III. Título.

CDU 616.993.161

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marcus Vinicius Gouvêa

**Desenvolvimento e validação de modelo preditivo e avaliação de testes de diagnóstico
por classe latente para o parasitismo por *L. chagasi* em cães atendidos no Hospital
Veterinário Universitário da UFPI, Teresina**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Epidemiologia.

Aprovada em 30 de abril de 2010.

Banca Examinadora:

Guilherme Loureiro Werneck (Orientador)
Instituto de Medicina Social – UERJ

Antonio Jose Leal Costa
Instituto de Estudos de Saúde Coletiva – UFRJ

Fabiano Borges Figueiredo
Fundação Oswaldo Cruz – IPEC/FIOCRUZ

José Ueleres Braga
Instituto de Medicina Social – UERJ

Reinaldo Souza dos Santos
Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

Àquele que me fez ver que, por mais difícil que às vezes o seja, o caminho a ser seguido é sempre puro, simples e tranqüilo.

Aos tolos que, todo dia, contribuem em me mostrar a verdade.

AGRADECIMENTOS

Àquele que me fez acordar.

À Débora e Luíza, sempre ao meu lado. Débora, companheira incansável. Agradeço por existirem na minha vida.

Ao amigo e professor Guilherme. Sinto que manteve a confiança em mim, por mais que a distância e alguns fatos da vida tenham me atingido durante esta trajetória. A ele, os mais sinceros agradecimentos. Espero que todo este tempo em que trabalhamos juntos, seja apenas, um começo.

Aos meus pais.

Aos colegas em Teresina, que tornaram possível este trabalho. Não foi possível conhecê-los pessoalmente, mas reconheço o trabalho deles e me orgulha ter participado de uma parte deste grande estudo.

Aos professores que contribuíram para a construção deste trabalho.

Aos colegas da Biologia Molecular do Lanagro/SP.

À amiga Margarida pela ajuda.

A todos que direta ou indiretamente possibilitaram a execução desta tese.

... e por não estar cheio de si mesmo pode parecer que está gasto, inútil e desprovido da
perfeição temporal dos homens.

Lao Tse

Renunciai à vossa pretensa cultura e todos os problemas se resolvem

Lao Tse

...antes de Abraão nascer, Eu Sou

Jesus Cristo

Eu Sou o que Sou

Jesus Cristo

RESUMO

GOUVÊA, Marcus Vinicius. *Desenvolvimento e validação de modelo preditivo e avaliação de testes de diagnóstico por classe latente para o parasitismo por *L. chagasi* em cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário da UFPI, Teresina*. 2011. 87 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma doença em expansão no Brasil, para a qual se dispõem de poucas, e aparentemente ineficientes, estratégias de controle. Um dos grandes problemas para a contenção da leishmaniose visceral americana é a falta de um método acurado de identificação dos cães infectados, considerados os principais reservatórios da doença no meio urbano. Neste sentido, a caracterização de marcadores clínico-laboratoriais da infecção neste reservatório e a avaliação mais adequada do desempenho de testes para diagnóstico da infecção podem contribuir para aumentar a efetividade das estratégias de controle da LVA. Com isso, o presente estudo tem dois objetivos principais: (1) desenvolver e validar um modelo de predição para o parasitismo por *Leishmania chagasi* em cães, baseado em resultados de testes sorológicos e sinais clínicos e (2) avaliar a sensibilidade e especificidade de critérios clínicos, sorológicos e parasitológicos para detecção de infecção canina por *L. chagasi* mediante análise de classe latente. O primeiro objetivo foi desenvolvido a partir de estudo em que foram obtidos dados de exames clínico, sorológico e parasitológico de todos os cães, suspeitos ou não de LVA, atendidos no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí (HVU-UFPI), em Teresina, nos anos de 2003 e 2004, totalizando 1412 animais. Modelos de regressão logística foram construídos com os animais atendidos em 2003 com a finalidade de desenvolver um modelo preditivo para o parasitismo com base nos sinais clínicos e resultados de sorologia por Imunofluorescência Indireta (IFI). Este modelo foi validado nos cães atendidos no hospital em 2004. Para a avaliação da área abaixo da curva ROC (auROC), sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP), valores preditivos negativo (VPN) e acurácia global, foram criados três modelos: um somente baseado nas variáveis clínicas, outro considerando somente o resultado sorológico e um último considerando conjuntamente a clínica e a sorologia. Dentre os três, o último modelo apresentou o melhor desempenho (auROC=90,1%, sensibilidade=82,4%, especificidade=81,6%, VPP=73,4%, VPN=88,2% e acurácia global=81,9%). Conclui-se que o uso de modelos preditivos baseados em critérios clínicos e sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina pode ser de utilidade no processo de avaliação da infecção canina, promovendo maior agilidade na contenção destes animais com a finalidade de reduzir os níveis de transmissão. O segundo objetivo foi desenvolvido por meio de um estudo transversal com 715 cães de idade entre 1 mês e 13 anos, com raça variada avaliados por clínicos veterinários no HVU-UFPI, no período de janeiro a dezembro de 2003. As sensibilidades e especificidades de critérios clínicos, sorológicos e parasitológicos para detecção de infecção canina por *Leishmania chagasi* foram estimadas por meio de análise de classe latente, considerando quatro modelos de testes e diferentes pontos de corte. As melhores sensibilidades estimadas para os critérios clínico, sorológico e parasitológico foram de 60%, 95% e 66%, respectivamente. Já as melhores especificidades estimadas para os critérios clínico, sorológico e parasitológico foram de 77%, 90% e 100%, respectivamente. Conclui-se que o uso do exame parasitológico como padrão-ouro para validação de testes diagnósticos não é apropriado e que os indicadores de acurácia dos testes avaliados são

insuficientes e não justificam que eles sejam usados isoladamente para diagnóstico da infecção com a finalidade de controle da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Modelo preditivo. Classe latente. Diagnóstico.

ABSTRACT

American visceral leishmaniasis (AVL) is an expanding disease in Brazil, for which few, and apparently inefficient, control strategies are available. A major problem for the containment of visceral leishmaniasis is the lack of an accurate test for the identification of infected dogs, which are considered the main reservoirs of the disease in urban areas. In this sense, the characterization of clinical and laboratory markers of the infection in this reservoir, as well as, a more appropriate assessment of the performance of tests for the diagnosis of infection, might increase the effectiveness of control strategies for AVL. Thus, this study has two main objectives: (1) to develop and validate a prediction model for parasitism by *Leishmania chagasi* in dogs, based on the results of serological tests and clinical signs and (2) to evaluate the sensitivity and specificity of a clinical criterion, and of parasitological and serological tests for canine infection by *L. chagasi* using latent class analysis. The first goal was developed from a study in which clinical, serological and parasitological data were obtained for all dogs, suspicious or not to AVL, admitted at the Veterinary Hospital at the Federal University of Piauí, Teresina, in the years of 2003 and 2004, totaling 1412 animals. Logistic regression models were constructed with the animals admitted in 2003 with the aim of developing a predictive model for parasitism based on clinical signs and results of serology by indirect immunofluorescence (IIF). This model was validated in dogs admitted at the hospital in 2004. To evaluate the area under the ROC curve (AuROC), sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and overall accuracy, three models were developed: one based only on clinical variables, other only with the serological results and a final model based on both the clinical and serological data. Among the three, the last model showed the best performance (AuROC=90.1%, sensitivity 82.4%, specificity=81.6%, PPV=73.4% NPV=88.2% and overall accuracy=81.9%). It is concluded that the use of predictive models based on clinical and serological data for diagnosis of canine visceral leishmaniasis might be useful in the evaluation of canine infection, allowing the anticipation of containment of these animals in order to reduce transmission levels. The second goal was developed through a cross-sectional study of 715 dogs aged between 1 month and 13 years, with varied races evaluated by veterinarians at VUH-UFPI in the period January to December 2003. The sensitivities and specificities of clinical, parasitological and serological tests for detection of canine infection by *Leishmania chagasi* were estimated using latent class analysis, considering four types of models and different cutoffs. The best sensitivity estimates for the clinical, serological and parasitological tests were 60%, 95% and 66% respectively. The best estimates for the specificity of clinical, serological and parasitological tests were 77%, 90% and 100% respectively. It is concluded that the use of parasitological assays as the gold standard for validation of diagnostic tests is not appropriate and that the indicators of accuracy of the tests evaluated are insufficient to justify that they are used alone for diagnosis of infection in order to control the disease.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Predictive model. Latent class analysis. Diagnostic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo (WHO, 2011).....	16
Figura 2 Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil – 1985 a 2009 – (Brasil. Ministério da Saúde/DATASUS).....	18
Figura 3 - Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral segundo município, Brasil 2002 (Brasil. Ministério da Saúde, 2006).....	19
Figura 4 - Taxas de incidência de LVA no PI: 1990 a 2005. MS/SINAN.....	21
Figura 5 - Estado do Piauí no contexto do Brasil.....	35
Figura 6 - Cidade Teresina no contexto do estado do Piauí.....	35

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACL	Análise de Classe Latente
auROC	Área abaixo da curva ROC/ area under ROC
AVL	American Visceral Leshmaniasis
BA	Bahia
CDC	Centro de Controle de Doenças – EUA
DOU	Diário Oficial da União
HVU	Hospital Veterinário Universitário
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IFI	Imunofluorescência Indireta
IIF	Indirect Immunofluorescence
LCA	Latent Class Analysis
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
MA	Maranhão
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MC	Modelo Clínico
MG	Minas Gerais
MS	Mato Grosso do Sul
MFR	Receptores manose/fucose
N	Tamanho amostral
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Parasitismo
PI	Piauí
PMT	Prefeitura Municipal de Teresina
PPV/NPV	Predictive Positive Value/ Negative Predictive value
RC	Razão de Chance
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RJ	Rio de Janeiro
ROC	Receiver Operator Characteristic Curve

RN	Rio Grande do Norte
SP	São Paulo
Sb ⁵⁺	Base pentavalente do Stibogluconato
S	Sorologia
UFPI	Universidade Federal do Piauí
TO	Tocantins
VPP/VPN	Valor Preditivo Positivo/Valor Preditivo Negativo
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	REVISÃO.....	16
1.1	Distribuição e carga da doença.....	16
1.2	Aspectos gerais da leishmaniose visceral.....	18
1.3	Aspectos gerais da LVA.....	19
1.4	LVA em Teresina – PI.....	20
1.5	Ciclo biológico.....	23
1.6	Clínica e diagnóstico no homem.....	24
1.7	Clínica, epidemiologia e diagnóstico da LV no cão.....	25
1.8	Tratamentos canino e humano.....	29
1.9	Controle da LVA.....	30
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS.....	34
1.1	Objetivo geral.....	34
1.2	Objetivos específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Área do estudo.....	35
4.2	Desenho de estudo e amostragem.....	36
4.3	Variáveis de estudo e coleta de dados.....	36
4.4	Análises estatísticas.....	37
4.5	Aspectos éticos.....	39
5	ARTIGOS.....	40
5.1	Artigo 1 - Fatores preditivos para o parasitismo canino por <i>Leishmania</i>	
5.2	<i>Chagasi</i> em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade	
	Federal do Piauí, Teresina.....	40
5.2	Artigo 2 - Avaliação de testes de diagnóstico para Leishmaniose	
	Visceral Canina por meio de análise de classe latente.....	57
6	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICE – Populações observadas e esperadas nos diferentes	

modelos	de	85
ACL		
APÊNDICE – Cálculo da probabilidade na Análise de Classe		
Latente		87

INTRODUÇÃO

A atividade humana tem modificado a ecologia e comportamento de muitas doenças infecciosas no mundo. Alterações nos micro e macro ambientes vêm propiciando o surgimento de epidemias, principalmente em países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A leishmaniose visceral americana (LVA), causada pelo protozoário *Leishmania chagasi*, é um exemplo de doença infecciosa reemergente (ARIAS; MONTEIRO; ZICKER, 1996); sendo também um exemplo de doença negligenciada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Doença característica de áreas rurais, começou a ocorrer em ambiente periurbano (CUNHA et al., 1995), para depois atingir áreas urbanas como São Luiz (MA), Natal (RN), Teresina (PI), Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS) e Campo Grande (MS), entre outras (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990; BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006).

Processos migratórios desordenados com a formação de grupos multi-espécies (ou seja, a reorganização de pessoas e de grupos humanos convivendo com outras espécies no seu cotidiano) (FARACO; SEMINOTTI, 2004), introduzindo grande número de indivíduos suscetíveis em áreas endêmicas, causando urbanização não planejada e conseqüente condição de vida inadequada, excessiva aglomeração domiciliar e alterações ambientais podem ser responsáveis pela mudança do padrão epidemiológico da LVA e sua ocorrência em grandes cidades (COSTA et al., 2005; CUNHA et al., 1995).

Acredita-se que o cão é o principal reservatório da leishmaniose visceral americana (CABRERA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005), estando intimamente relacionado com a ocorrência da leishmaniose humana (TOLEZANO et al., 2007). Ainda há debates na literatura sobre o real papel do cão como responsável pela transmissão da doença para humanos. Entretanto, não há casos relatados de epidemias humanas sem a presença de cães acometidos pela doença (OLIVEIRA et al., 2008). Estudos têm mostrado que a presença do cão pode funcionar como um fator de risco ou associado com o aumento da probabilidade de ocorrência de casos humanos, além de mostrarem correlação na distribuição espacial entre os casos de leishmaniose em ambas as espécies (CAMARGO-NEVES et al., 2001, GOUVÊA et al., 2007).

No Brasil, as estratégias de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde baseiam-se

principalmente na eliminação de cães positivos, controle de vetores, detecção precoce e tratamento de casos humanos e educação em saúde (BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006). Entretanto, estas estratégias não têm se mostrado efetivas para o controle da doença, tendo a mesma se espalhado cada vez mais para diferentes áreas urbanas (OLIVEIRA et al., 2008).

O sacrifício canino como ferramenta de controle ainda esbarra em vários problemas, como: existência de reposição canina após a eliminação de cães infectados, continuidade na execução das ações, medida de pouco apoio comunitário, existência de outros reservatórios (por exemplo, raposa e marsupiais), inexistência de testes diagnósticos altamente sensíveis e específicos para detecção da infecção canina em cães assintomáticos, que podem também participar na transmissão da doença (OLIVEIRA et al., 2008; DYE, 1996). Este último ponto é ainda mais crítico porque os resultados dos testes diagnósticos comumente utilizados podem não se correlacionar corretamente com a capacidade de transmissão do animal (BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006; TRAVI et al., 2001).

Neste sentido, o desenvolvimento de uma regra de predição de cães infectados poderia contribuir para o melhor e mais rápido direcionamento das políticas públicas de contenção da enfermidade. Assim, este estudo teve como um de seus objetivos o desenvolvimento de um modelo preditivo para positividade parasitária da leishmaniose visceral canina, a partir de sinais clínicos e testes sorológicos para a enfermidade.

Mesmo considerando o fato de que a observação direta do parasita através do exame microscópico parasitológico possa ser o mais confiável possível, para a classificação do animal como positivo ou negativo, este teste, considerado muitas vezes como padrão-ouro, também possui reconhecidas limitações e está sujeito a erros, particularmente no que diz respeito a sua sensibilidade, ou seja, capacidade de classificar corretamente os cães infectados. Com isso, este estudo objetivou também avaliar a sensibilidade e especificidade de critérios de diagnóstico sorológico, parasitológico e clínico, por meio de uma análise de classe latente.

1 REVISÃO

1.1 Distribuição e carga da doença

Por muitos anos (BADARÓ et al., 1986), e ainda hoje, o impacto das leishmanioses na saúde pública é subestimado. Isto decorre, em parte, da falta de testes de diagnóstico adequados para identificar infecções assintomáticas e fatores do hospedeiro que alteram a manifestação da doença. Nos últimos dez anos, porém, regiões endêmicas têm se ampliado, implicando no aumento do número de casos registrados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009d).

As leishmanioses são endêmicas em 88 países (22 do Novo Mundo e 66 do Velho Mundo) de cinco continentes: África, Ásia, Europa, Américas do Norte e do Sul, o que totaliza 350 milhões de pessoas sob risco (ALVAR et al., 2008; DESJEUX, 1996; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011a) (Figura 01 – cor ocre). Estão amplamente difundidas nas Américas, do Sul dos EUA ao Norte da Argentina (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Considera-se que dois milhões de novos casos de todos os tipos de leishmanioses ocorram no mundo, com uma estimativa de 12 milhões de pessoas atualmente infectadas (DESJEUX, 1996; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009d).

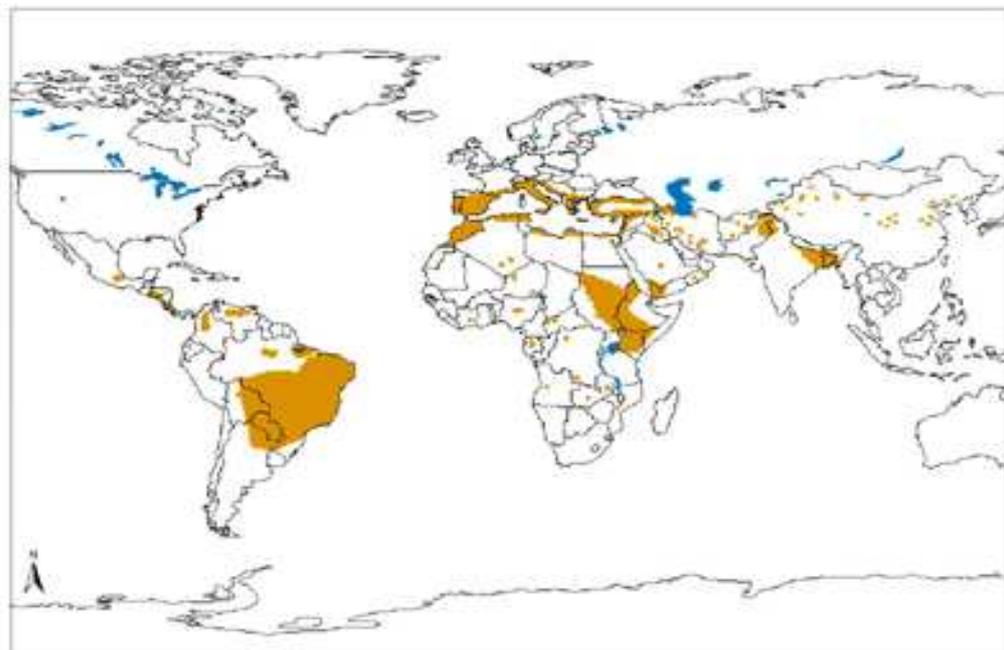


Figura 01 – Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011b).

A leishmaniose visceral (LV), forma mais grave da doença, é de notificação compulsória em 32 países, revelando um potencial número de casos não relatados (são cerca de 600.000 casos de LV relatados anualmente). Mais de 90% dos casos de LV no mundo ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011a).

Atualmente, 200 a 300 pessoas morrem de LV a cada ano no Brasil (COSTA, 2008). A doença que era considerada uma endemia rural com ciclos epidêmicos de dez anos, agora também ocorre em grandes cidades (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009c). No país, estes ciclos são acompanhados de picos epidêmicos, como o ocorrido em 2000 (Figura 02). É difícil explicar a incidência cíclica da doença, pois a relação ambiente-hospedeiro-parasito-vetor não é totalmente conhecida e a abundância de *Lu. longipalpis* varia muito no espaço e no tempo devido a razões ainda inexplicadas (THOMPSON et al., 2002).

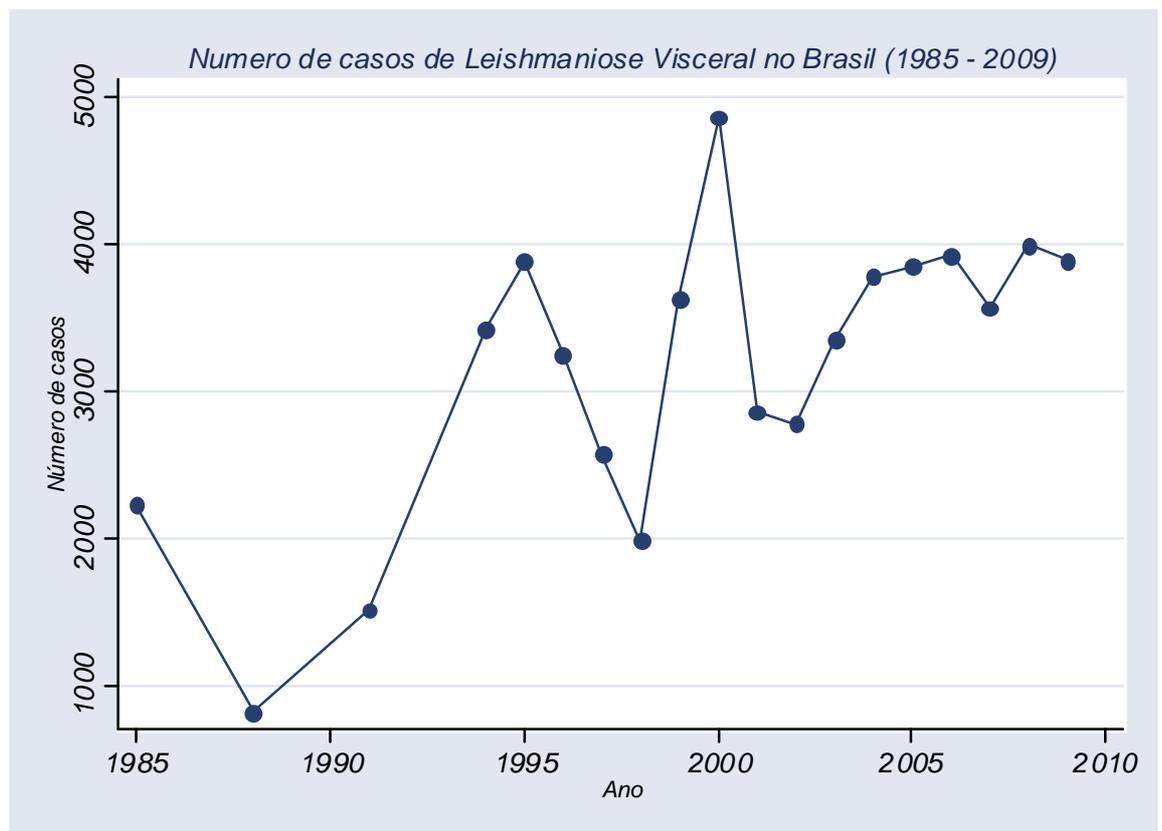


Figura 02 - Número de casos de Leishmaniose Visceral no Brasil – 1985 a 2010 (Brasil. Ministério da Saúde/DATASUS) .

No Brasil, na década de 1990, somente 10% dos casos de LVA ocorreram fora da região Nordeste. Entretanto, entre 2000 e 2002, houve uma redução para 77% o número de

casos desta região (BRASIL, 2006). Entre 2000 e 2004, mais que 30% dos casos foram relatados nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte (BRASIL, 2009) (Figura 03). Uma média de aproximadamente 3500 casos humanos ocorrem anualmente, com uma letalidade de 6% (BRASIL, 2005). Em 2008, 220 pessoas morreram de LVA no Brasil (Brasil. Ministério da Saúde/DATASUS).

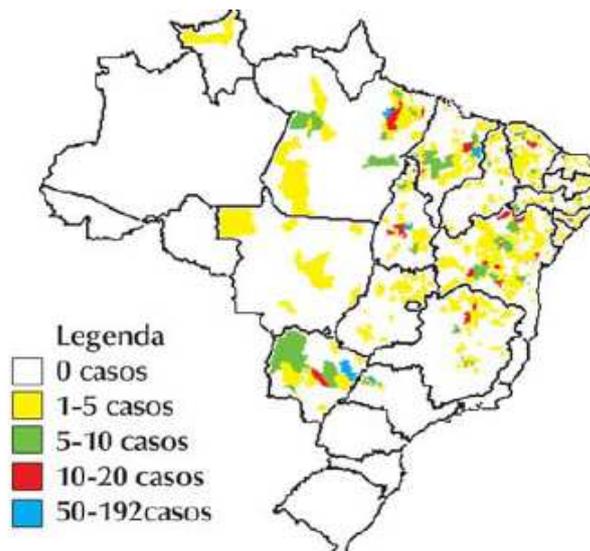


Figura 03 - Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral segundo município, Brasil 2002 (Brasil. Ministério da Saúde, 2006)

1.2 Aspectos gerais da leishmaniose visceral

As leishmanioses são doenças parasitárias que podem apresentar diversas manifestações clínicas. Está difundida no velho e novo mundo, com uma grande diversidade epidemiológica. São causadas por pelo menos 20 espécies de *Leishmania*, protozoários transmitidos pela picada da fêmea de flebotomíneos, que por sua vez são, no Velho Mundo, do gênero *Phlebotomus*, e no Novo Mundo do gênero *Lutzomyia*. Cerca de 30 espécies de flebotomíneos são comprovadas como vetores da doença. A maioria das formas da doença é zoonótica, com o homem sendo infectado secundariamente, mas nas formas antroponóticas, acredita-se que o homem seja o único reservatório (DESJEUX, 1996).

Assim, as leishmanioses incluem quatro principais entidades eco-epidemiológicas: leishmaniose visceral zooantroponótica e antroponótica e leishmaniose cutânea zooantroponótica e antroponótica. Nas formas antroponóticas, o homem é considerado a única

fonte de infecção para o vetor; já nos modelos zoonóticos, animais são considerados reservatório, mantenedores e disseminadores, através dos vetores, das *Leishmania spp* (DESJEUX, 2001). Podem ocorrer sob quatro formas clínicas principais: cutânea, visceral, cutânea difusa (forma lepromatosa da doença) e mucocutânea (Espundia) (DESJEUX, 1996; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009e).

A LV, também denominada calazar (palavra de origem hindu que significa Febre Negra), é uma doença endêmica em várias regiões do mundo, mas também capaz de causar surtos epidêmicos graves. Foi descrita por Leishman em 1901, que relatou os sinais clínicos da doença em humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009a). É causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, que abrange as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. No continente americano o agente do calazar é a *L. chagasi*, sendo que ainda não existe base genética suficiente para distingui-lo da *L. infantum* (REY, 2002). É caracterizada por febre irregular, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e/ou linfadenopatia, e anemia. Pode causar epidemias em larga escala, com casos fatais. Depois de recuperados, os pacientes podem desenvolver uma forma crônica de leishmaniose cutânea denominada leishmaniose cutânea pós calazar (“post kala-azar dermal leishmaniasis”) (DESJEUX, 1996).

1.3 Aspectos gerais da LVA

O calazar indubitavelmente autóctone foi primeiramente descrito no Brasil por Penna em 1934. As formas amastigotas do parasito foram descobertas ao acaso em fígados humanos submetidos a exame *post-mortem* por suspeita de febre amarela.

Nas Américas, a leishmaniose visceral se caracteriza principalmente por ocorrer em regiões tropicais e subtropicais, serem adquiridas através de repastos sanguíneos de flebotomíneos, manterem um ciclo envolvendo animais domésticos e/ou silvestres (seres humanos são hospedeiros finais, não necessários para a manutenção dos parasitos) (GRIMALDI; TESH, 1993), e atualmente se caracterizam por ocorrer de forma epidêmica em áreas urbanas (COSTA, 2008).

O cão é o principal reservatório urbano do calazar e os marsupiais podem ser naturalmente infectados e assintomáticos, podendo manter a *Leishmania sp* em seus órgãos (ALMEIDA et al., 2005; CABRERA et al., 2003). O ciclo doméstico da doença tem

participação do cão doméstico e o ciclo peridomiciliar tem a participação de cães de rua e canídeos silvestres de hábitos sinantrópicos (MORENO; ALVAR, 2002).

No Brasil, a forma de transmissão é através da picada dos vetores - *L. longipalpis* ou *L. cruzi*, infectados pela *Leishmania (L.) chagasi*, (BRASIL, 2006), insetos da família *Psychodidae*, ordem *Diptera* (VIEIRA; COELHO, 1998). Admite-se a hipótese da transmissão entre a população canina através da ingestão de carrapatos infectados e mesmo através de mordeduras, cópula, ingestão de vísceras contaminadas, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão para humanos ou na manutenção da enzootia (BRASIL, 2006).

Acredita-se que *Lu. longipalpis* represente um complexo de espécies irmãs que possuem habilidades diferentes de transmitir a *L. chagasi*, influenciando na manifestação de diferentes formas clínicas da doença (URIBE, 1999). Souza et al. (2003) relataram, na ocasião do estudo, a ausência de *Lu. longipalpis* em seis localidades do município do Rio de Janeiro com notificações de casos humanos autóctones, entendendo que as espécies *Lu. firmatoi* e *Lu. migonei* também apresentam importância epidemiológica na transmissão da LVA. Cabrera et al., 2003, por outro lado, detectaram maior presença de *Lu intermedia* e *Lu migonei* em Barra de Guaratiba, localidade do município do Rio de Janeiro onde há ocorrência de casos caninos de LV.

Isto indica a variabilidade de espécies de flebotomíneos vetores, que podem ocorrer em diferentes regiões, capazes de carrear e transmitir o parasito *L. chagasi*, o que torna o processo de transmissão variável e extremamente complexo.

1.4 LVA em Teresina – PI

Desde a década de 1970, vem sendo verificado em Teresina, um fenômeno epidemiológico importante: a urbanização da endemia (VIEIRA; COELHO, 1998). A população de Teresina em 1991 era de 599.272 habitantes, aumentou consideravelmente em 2007 quando atingiu 779.939 habitantes (IBGE) e estima-se que em 2010, a capital tenha atingido o número de 814.439 habitantes (IBGE, 2011).

Entre 1971 e 1979 a LVA apresentava-se endêmica no Piauí. A partir de 1980, observou-se uma mudança no perfil epidemiológico da doença no Piauí, com uma epidemia de vasta extensão territorial concentrando-se especialmente na área urbana de Teresina. É no

período de 1980 a 1986 que se caracteriza no Brasil o processo de urbanização da LV, antecedendo o que viria a ocorrer ainda nesta década nas cidades de São Luis/MA e Natal/RN (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990; JERÔNIMO et al., 1994; SILVA et al., 1997).

Na epidemia de Teresina, houve uma mudança no perfil epidemiológico da doença neste estado. Houve predomínio de casos em áreas urbanas de clima tropical com precipitação pluviométrica superior a 1200mm em altitudes inferiores a 200m (COSTA et al., 2000). Fatores geográficos como distância de rios, topografia, pluviometria e cobertura vegetal têm sido relatados como fatores independentemente associados com a distribuição e incidência da LV (ELNAIEM et al., 2003). Estes fatores podem influenciar a população de vetores e reservatórios da *L. donovani*, por exemplo, uma vez que interferem em fatores microclimáticos (ELNAIEM et al., 2003; GOMEZ et al., 1998). Os principais locais de assentamento de migrantes em Teresina, na época da epidemia, localizavam-se nas periferias das áreas urbanas, sul e nordeste. Em 1980, a epidemia começou em bairros novos de migrantes para só depois atingir áreas de ocupação antiga (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990). No Nordeste do Brasil a maciça migração das pessoas das áreas rurais para as urbanas resultou em um crescimento rápido e descontrolado das cidades. Os subúrbios se expandiram para áreas anteriormente rurais, colocando inúmeras pessoas em contato com o ciclo silvestre da *L. chagasi*. (JERÔNIMO et al., 1994).

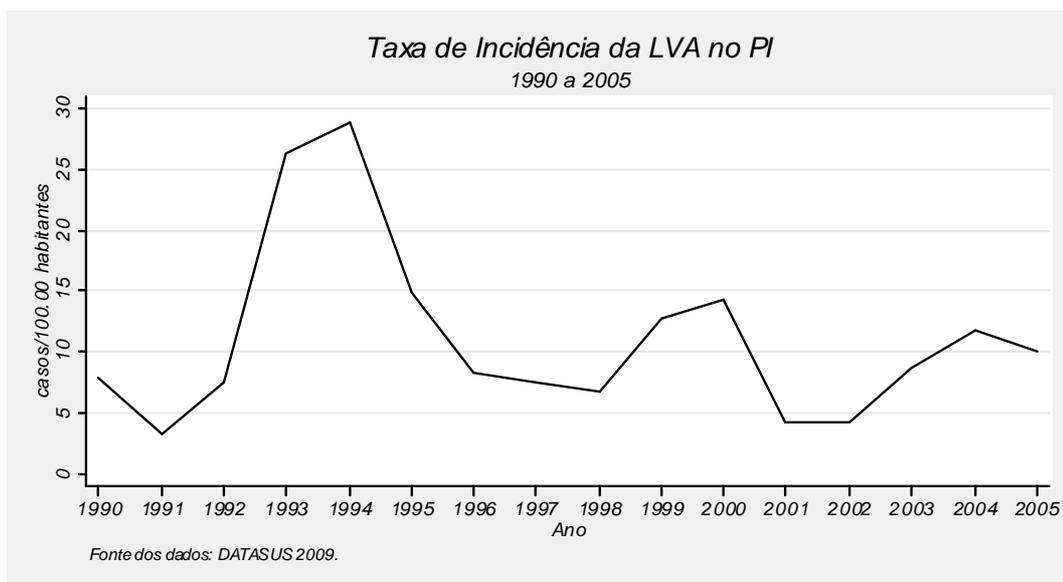


Figura 04 – Taxas de incidência de LVA no PI: 1990 a 2005.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde/SINAN. Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2005.

A figura 04 mostra as taxas de incidência de LVA no PI entre os anos de 1990 a 2005.

Em 2004, num dos picos epidêmicos do Piauí, Teresina registrou uma taxa de incidência de 22,69 casos/100.000 habitantes. Mesmo que nos anos de 2000 e 2001 o estado do PI tenha registrado apenas 4 casos/100.00 habitantes, Teresina registrou mais de 10 casos por 100.000 habitantes (Fonte: Brasil. Ministério da Saúde/SINAN.).

Um dos fatores que favoreceu a instalação e endemicidade com surtos epidêmicos da LVA em Teresina, foi as secas. Estas se caracterizavam por migrações desordenadas de pessoas e de animais domésticos do interior para a capital, criando excelentes condições para o vetor (*Lu longipalpis*) e manutenção do ciclo da doença. Nos subúrbios onde se instalaram os migrantes, as condições sanitárias eram deploráveis (WORLD..., 2002).

Diversos fatores sócio-econômicos e ambientais estão relacionados à migração de contingentes populacionais para subúrbios pobres das cidades. Ondas de desemprego, falta de terras disponíveis para cultivo, além da fome ocasionaram a formação de aglomerados densamente povoados sem infra-estrutura sanitária. Este padrão de migração para áreas urbanas levou a formação de megalópoles, onde as condições de habitação e saneamento inadequadas, principalmente nas periferias, criaram oportunidades para a transmissão de doenças como a LVA, pois os parasitos encontraram um vasto número de hospedeiros não imunes e desnutridos (SILVA et al., 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002, 2009b). Observa-se que a ocorrência de LV está associada a precárias condições econômicas e sociais das comunidades afetadas, conjuntura que se expressa em condições precárias de moradia e baixos níveis nutricionais (VIEIRA; COELHO, 1998).

Teresina é pontilhada por lotes vazios e quintais bem arborizados e cercada por grandes favelas, ocupadas basicamente por desempregados e subempregados muito pobres (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990). São nas favelas e nos vales dos rios com águas estagnadas que se instalam os migrantes. Em ambos locais são criadas condições adequadas para a eclosão de surtos epidêmicos, pois são propiciados os contatos de indivíduos suscetíveis com fontes de infecção humana, com reservatórios domésticos nas cidades ou reservatórios silvestres nas áreas rurais (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990). Isto ocorre também em outros estados do Nordeste como o Ceará (THOMPSON et al., 2002).

Entre 1980 e 1986, época da primeira epidemia de LVA no PI, 46% dos casos em que a idade foi registrada eram em indivíduos menores de cinco anos, com uma sensível predominância no sexo masculino. A maior incidência da LVA no grupo de menor idade depende de maior suscetibilidade e não de maior exposição ao parasito (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990). Este grupo só se torna mais exposto quando os vetores aumentam em número e penetram no ambiente domiciliar (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO et al., 1990).

Estas migrações desordenadas, além de favorecerem a concentração de pessoas nas periferias, fomenta a agricultura de subsistência local, com alteração da terra e do ambiente de vegetação em área peridomiciliar. Apesar de pouco se saber sobre este assunto, parece que as áreas de terras roçadas e cultivadas são locais mais propícios para a presença do vetor, do que áreas florestadas e de campos abertos (THOMPSON et al., 2002). Neste estudo, estes autores detectaram em Canindé, estado do Ceará, maior presença de *Lu. longipalpis* em áreas peridomésticas próximas a plantações de feijão e milho, em locais com grande presença de cães e alta umidade.

Em estudo realizado em Teresina, Costa et al. (2005), detectaram que pessoas vivendo sob condições de excessiva aglomeração nas casas, inadequado sistema de esgotamento sanitário e/ou de coleta de lixo/entulho tinham maior risco de desenvolvimento de LVA.

Em 2006 a proporção de pobres no Piauí era de 59,01%, muito alta quando comparada com estados como SP (16,84%) e RJ (20,24%). A renda *per capita* em 2004 chegou a R\$ 2.892,17, enquanto que no Sudeste a estimativa da média da renda *per capita* foi de R\$ 12.000. Não só sob aspectos econômicos, mas também de provimentos urbanos básicos, Piauí fica aquém de outros estados, principalmente do Sul e Sudeste. Por exemplo, a proporção de pessoas com cobertura do serviço de coleta de lixo no Piauí em 2006 era de 49,63%, enquanto que na região Sudeste era de mais de 90%. Para o mesmo ano, 61,72% das pessoas no Piauí eram cobertas pelo serviço de esgotamento sanitário, enquanto que na região Sudeste este percentual era de mais de 80% (Brasil. DATASUS/Ministério da Saúde).

1.5 Ciclo biológico

Parasitas do gênero *Leishmania* possuem três diferentes micro-habitats durante o ciclo de vida, o que os permitem assumir diferentes formas: no intestino do vetor e nos espaços inter e intracelulares dos vertebrados. São encontrados na forma promastigota no invertebrado e amastigota no vertebrado (MOLYNEUX et al., 1977).

As formas amastigotas encontradas em constante multiplicação por fissão binária nos macrófagos dos vertebrados provocam a ruptura celular devido ao grande número de parasitos. Isto permite o acesso ao meio intersticial (REY, 2002). Há também o acesso a este meio com a ruptura dos macrófagos no momento do repasto sanguíneo do vetor (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987).

Quando as formas amastigotas são sugadas pelo vetor, se transformam em promastigotas no trato digestivo torácico deste. Neste local há a formação de uma membrana peritrófica e multiplicação (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987), por fissão binária (BOGITSH; CHENG, 1998), dos protozoários. Com a ruptura desta membrana, o parasito acessa os tratos digestivos anterior e posterior, além da probóscide do inseto. Acredita-se que a membrana peritrófica possa funcionar como fator de controle para o potencial do vetor em transmitir o parasito (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987). Em um próximo repasto sanguíneo, as formas promastigotas livres na probóscide do vetor são inoculadas no hospedeiro vertebrado. Neste, o parasito é fagocitado por macrófagos em fagocitose dependente da atividade do protozoário (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987). Esta fagocitose é mediada pelos receptores manose/fucose (MFR) e complemento tipo 3 (CR3) existentes na membrana do parasito (MEHLHORN et al., 1988). Após a fagocitose, o parasito promove a formação intracelular de um vacúolo endocítico parasitóforo, onde ocorre a sua multiplicação (BOGITSH; CHENG, 1998). Os macrófagos diferenciados nos tecidos como monócitos podem carrear o parasito a todos os pontos do organismo hospedeiro (REY, 2002).

1.6 Clínica e diagnóstico no homem

O desfecho e sucesso das infecções por *Leishmania spp* dependem da resposta imune do hospedeiro, da virulência do parasito, de fatores externos, do escape do parasito do sistema imune, do seu acoplamento, endocitose e sobrevivência nos macrófagos (GRIMALDI; TESH, 1993). A LV pode se manifestar nas formas subclínica ou inaparente, indeterminada, moderada e grave (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). As formas benignas da doença freqüentemente resultam em proteção contra reinfeção através de imunidade mediada por célula, que é a forma imune mais efetiva na resposta à infecção (GRIMALDI; TESH, 1993).

A doença caracteriza-se principalmente por causar febre (dois picos por dia, principalmente em áreas endêmicas) (BOGITSH; CHENG, 1998), sintoma mais freqüente (SILVA et al., 2001), anemia, hepatoesplenomegalia e progressiva perda de peso (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Pode se caracterizar pela ocorrência de lesões na pele de pacientes tratados e/ou recuperados, caracterizando a leishmaniose dérmica pós calazar (REY, 2002). Pelo fato dos parasitos afetarem o Sistema Retículo Endotelial do hospedeiro, ocorre a constante proliferação de células, devido à destruição dos órgãos deste Sistema, o que leva à

hiperplasia dos mesmos. A anemia ocorre por acometimento da medula óssea o que leva também à leucopenia, deixando o indivíduo suscetível à infecções secundárias. Sem tratamento, a condição é frequentemente fatal (BOGITSH; CHENG, 1998).

Os achados clínicos da LV não são patognômicos (SIVAKUMAN; SINGH, 2003). Há várias enfermidades que possuem sintomas e sinais semelhantes aos da LV. Assim, o diagnóstico diferencial da leishmaniose visceral deve ser feito para doenças como malária, síndrome da esplenomegalia tropical, febre tifóide, tuberculose miliar, hipertensão portal, leucemias, linfomas e anemia hemolítica (KAFETZIS, 2003).

Assim sendo, testes de laboratório tornam-se importantes ferramentas para confirmação da suspeita clínica. Dentre estes testes podemos citar: isolamento do parasito de tecidos apropriados (SIVAKUMAN; SINGH, 2003), que pode retardar o diagnóstico por semanas (GUERIN et al., 2002). Há testes sorológicos como Imunofluorescência Indireta, ELISA, Immunoblotting e detecção de antígeno em látex (importante para diagnóstico de imunocomprometidos) (ASSIS et al., 2008). Há também testes de imunidade tardia como Intradermorreação de Montenegro; testes moleculares como o PCR (SIVAKUMAN; SINGH, 2003), que apresentam sensibilidade e especificidade acima de 90%, mas tem custo muito elevado (ASSIS et al., 2008); e testes para detecção de marcadores fisiológicos (SIVAKUMAN; SINGH, 2003).

Em relação à leishmaniose visceral humana, é interessante também ressaltar os freqüentes casos de co-infecção com o HIV. O primeiro caso relatado de coinfeção *Leishmania sp* com HIV foi em 1985. No Brasil, a transmissão do HIV tem sido relatada em regiões com baixa taxa de urbanização, onde a LV também pode ser transmitida (ALVAR et al., 2008).

1.7 Clínica, epidemiologia e diagnóstico da LV no cão

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença zoonótica severa que afeta milhões de cães na Europa, Ásia, África e Américas (MORENO; ALVAR, 2002). O cão infectado é um dos principais fatores associados à infecção por *L. chagasi* em humanos (SILVA et al., 2001). São animais populares em muitos países. Vários fatores levam as pessoas a ter um cão como: companhia, afeto, presença de crianças em idade escolar no domicílio, segurança da propriedade, entre outros (LESLIE et al., 1994). Estudos revelam que

a posse de cão varia entre regiões, entre áreas urbana e rural, entre religiões e entre características e comportamentos humanos (KNOBEL et al., 2008; LESLIE et al., 1994; WESTGARTH et al., 2007). Estes estudos podem fornecer subsídios para orientação da adoção de medidas de intervenção para doenças zoonóticas.

A leishmaniose visceral canina é caracterizada clinicamente por perda de peso, aumento dos linfonodos, hepatoesplenomegalia, ceratoconjuntivite, onicogribose, alopecia, dermatite, ulcera na pele, anemia e coagulopatias, sendo estas representadas principalmente por hemoptise e emaciação (SILVA et al., 2008; TRAVI et al., 2001).

Os cães podem apresentar-se assintomáticos, oligossintomáticos, com a presença de adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pêlo opaco, ou sintomáticos, com todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores (BRASIL, 2006).

A gravidade dos sintomas da doença está diretamente relacionada com a alta capacidade de transmissão do parasito do cão para o vetor (TRAVI et al., 2001), provavelmente devido à alta carga parasitária.

O intenso parasitismo cutâneo, a presença em áreas peridomésticas, sua capacidade de dispersão e o potencial de transmissão mesmo na ausência de sinais clínicos, salientam a grande importância epidemiológica do cão como principal fonte de infecção para *Lu. longipalpis* e, então, para o homem e outros animais (SILVA et al., 2001). Travi et al. (2001) mostraram que cães assintomáticos são pouco transmissores do parasito para os vetores, quando comparados com cães pouco ou muito sintomáticos. Porém, cães que se tornaram assintomáticos e que no início da doença sofreram de graves sintomas, são mais infectantes para o vetor. No Brasil, a forma assintomática da doença é encontrada com índices variados, geralmente representando 40 a 60% de uma população canina soropositiva (BRASIL, 2006).

Estudos realizados em Araçatuba, São Paulo, revelaram que a prevalência humana de LVA foi maior em áreas de alta prevalência de infecção canina (CAMARGO-NEVES et al., 2001). Dados similares, em relação à LV, foram encontrados por Gavgani et al. (2002), no Irã. Outros fatores, além da presença de cães, podem ser responsáveis pelo aumento do risco de infecção e desenvolvimento da doença em humanos, como a densidade vetorial, a taxa de infecção parasitária canina e a vulnerabilidade dos suscetíveis (VIEIRA; COELHO, 1998).

Werneck (2002) explica que o calazar canino pode ser fator de risco para o calazar humano, principalmente em casos de baixos níveis socioeconômicos. Este mesmo autor cita a ocorrência de altos níveis de prevalência de infecção canina antes ou durante epidemias

humanas em Teresina, PI.

Em estudo realizado em Teresina, PI, COSTA et al. (1999), citam a possível não participação do cão como fator de risco na transmissão indireta da LVA para humanos. Cita também que há a necessidade de estudos mais aprimorados que mostrem que a LVA é primariamente adquirida por transmissão indireta de cães.

Segundo Di Lorenzo e Proietti (2002) a leishmaniose visceral canina não é causa suficiente para a ocorrência de casos de leishmaniose visceral humana, mas não deve ser descartada como causa necessária ou fator de risco. A maior prevalência de leishmaniose visceral canina não necessariamente se correlaciona de maneira positiva direta com a maior prevalência da leishmaniose visceral humana. Isto pode se dever a uma série de fatores como: difícil efetividade da busca ativa de casos caninos, falta de padronização dos métodos diagnósticos para estes animais, o que resulta em baixa estimativa de verdadeiros positivos, ou seja, a não identificação de todos os indivíduos de fato positivos (TRAVI et al., 2001). Além disso, podem ocorrer números consideráveis de infecções assintomáticas em humanos, além da interferência de fatores como idade e estado nutricional. A falta de métodos diagnósticos padronizados para humanos também interfere na correlação das prevalências da doença entre cães e homens (DI LORENZO; PROIETTI, 2002).

Os principais procedimentos diagnósticos laboratoriais são a realização de provas sorológicas como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), fixação do complemento e aglutinação direta. Atualmente, para inquéritos em saúde pública os exames disponíveis para diagnóstico sorológico são a RIFI e o ELISA, que expressam os níveis de anticorpos circulantes (BRASIL, 2006). A fim de se otimizar o ELISA padrão, foram desenvolvidos muitos testes, inclusive com antígenos purificados, mas mesmo assim, o problema de reação inespecífica com outros tripanossomatídeos não foi totalmente contornado (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

O tipo de teste diagnóstico a ser utilizado para a detecção de cães positivos para a LVC pode variar com a situação de interesse. Deve-se levar em conta alguns pontos como, por exemplo, se o teste é para: detecção de cães positivos que apresentam sinais clínicos; checar a infecção de cães que tiveram contato com outros positivos; estudo epidemiológico; controle de trânsito zoonosológico; remoção de cães infectados de áreas de transmissão (GOMES et al., 2008).

O diagnóstico parasitológico é o método de certeza e se baseia na demonstração do parasito obtido de material biológico de punção hepática, de linfonodos, esplênica, de medula óssea e biópsia ou escarificação de pele. É um método seguro de diagnóstico, uma vez que o

resultado positivo é dado pela observação direta de formas amastigotas. A especificidade do método é de aproximadamente 100%, e a sensibilidade depende do grau de parasitemia, tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina, estando em torno de 80% para cães sintomáticos e menor ainda para cães assintomáticos (BRASIL, 2006). Baneth e Aroch (2008) citam que este tipo de diagnóstico pode não ser sensível em casos de doença clínica moderada, pois o parasito pode não ser detectado nos tecidos.

De uma maneira geral o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública. A problemática deve-se principalmente a três fatores: i) variedade de sinais clínicos semelhantes às observadas em outras doenças infecciosas; ii) alterações histopatológicas inespecíficas e iii) inexistência de um teste diagnóstico altamente específico e sensível (BRASIL, 2006).

Os resultados dos testes sorológicos utilizados na rotina de diagnóstico dos programas de controle da LVA nem sempre estão correlacionados com o status transmissor do animal (TRAVI et al., 2001). Corroborando tal informação, Baneth e Aroch (2008) citam que em áreas endêmicas uma proporção de cães desenvolve a doença sintomática, outra fração é resistente à infecção ou a resolve sem desenvolver sinais clínicos. Isso faz a LVC de difícil diagnóstico.

Assim, o diagnóstico da leishmaniose canina não pode ser eliminado simplesmente pelo resultado negativo da sorologia para a doença, sendo necessários no mínimo dois testes para a confirmação (TOLEZANO et al., 2007). Este autor refere-se à complementação por testes moleculares, como o PCR, o que poderia tornar inexequível o diagnóstico em rotinas de controle. O interesse na complementação com outro teste é que cães assintomáticos podem ser positivos na sorologia e negativos no PCR ou vice-versa. Muitos protocolos de PCR são baseados na análise do DNA a partir do sangue, entretanto, os parasitos são mais encontrados na pele e no sistema linfático (BANETH; AROCH, 2008). Já Almeida et al. (2005), citam a necessidade da realização de dois testes sorológicos, IFAT e ELISA, para detecção de cães infectados e assintomáticos, uma vez que seu estudo mostrou diferenças nas sensibilidade e especificidade dos testes.

A detecção de anticorpos no soro dos cães é indicativa de exposição à infecção. Baixos níveis de anticorpos são detectados em cães sem sintomas clínicos. Cães com altos títulos podem ser animais com infecções persistentes com manifestações clínicas ou não. O diagnóstico sorológico pode apresentar reação cruzada para tripanossomas que infectam cães (BANETH; AROCH, 2008).

Sugere-se que a patogenia do parasito no cão siga um padrão compartimentalizado,

sendo o sistema mononuclear fagocitário, o primeiro a atingir alta carga do protozoário quando comparado com a pele, por exemplo (TRAVI et al., 2001). Esta dinâmica no cão é um dos fatores que dificulta o diagnóstico parasitário. Isto torna, juntamente com a inacurácia dos testes de diagnóstico em detectar verdadeiros positivos e o custo de testes moleculares, que poderiam ser utilizados de forma complementar, a criação de modelos preditivos, a partir de sinais clínicos e resultados sorológicos de cães parasitados, de potencial relevância para subsidiar o controle da doença.

1.8 Tratamentos canino e humano

Os antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose visceral. Existem no mercado atualmente duas formulações de Sb^{+5} (substância base pentavalente) disponíveis: Stibogluconato de sódio e o antimoniato-N-metil glucamina, não parecendo existir diferença quanto à eficácia terapêutica destas formulações. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato N-metil glucamina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

Enquanto que no Brasil não existe documentação da presença de cepas de *L. chagasi* resistentes *in vitro* aos antimoniais, nos últimos anos, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América devido ao aparecimento de resistência primária do parasito a essas drogas, principalmente em países como Sudão, Quênia e Índia (BRASIL, 2006).

Algumas reações adversas podem ocorrer devido ao tratamento com este antimonial, sendo, nestes casos, necessária sua substituição por drogas alternativas: arritmias cardíacas e/ou outras manifestações de cardiotoxicidade, insuficiência renal aguda ou elevação dos níveis séricos de uréia e creatinina e/ou outras manifestações de nefrotoxicidade, icterícia e/ou elevação de enzimas hepáticas e/ou outras manifestações de hepatotoxicidade, pancreatite aguda e/ou hiperamilasemia (BRASIL, 2006).

Embora a literatura apresente possibilidades de tratamento da LV canina (BANETH; SHAW, 2002), a Portaria Interministerial de nº 1426, de 11/07/2008 proíbe o tratamento da LV canina com produtos de uso humano, ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Até o momento, segundo esta Portaria, não existe

fármaco ou esquema terapêutico que garanta a eficácia do tratamento canino, bem como a redução do risco de transmissão. Assim, esta Portaria considerou vários aspectos como: a possibilidade do risco de cães em tratamento manterem-se como reservatórios e fontes de infecção para o vetor; a existência de risco de indução a seleção de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses em seres humanos; e que não existem medidas de eficácia comprovada que garantam a não-infecciosidade do cão em tratamento (BRASIL, 2008; IKEDA-GARCIA et al., 2007).

1.9 Controle da LVA

No Brasil, as medidas preconizadas de controle podem se resumir em diagnóstico precoce, tratamento e assistência de casos humanos, controle químico do vetor, eutanásia de cães positivos e educação em saúde (BRASIL, 2006).

As autoridades e técnicos responsáveis têm sido forçados a encarar a LVA como uma epidemia de difícil e laborioso controle e que as medidas aplicadas da forma como tem sido exequíveis, são insuficientes para que se possam alcançar níveis satisfatórios de controle (Vieira e Coelho, 1998). Há uma grande variedade de situações epidemiológicas na ocorrência da LVA. Assim, é necessário que as estratégias de controle sejam flexíveis e aplicáveis em cada caso particular. (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Para a seleção de estratégias apropriadas de controle em uma determinada região geográfica, devemos avaliar os seguintes fatores: ocorrência e características de casos humanos; dinâmica da transmissão; etiologia; estudos ecológicos sobre os vetores e os reservatórios (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

A identificação dos tipos de transmissão é fundamental para a adoção das medidas de controle. Entre as formas de transmissão da LVA temos: domiciliar/peridomiciliar (doméstica/rural), extradomiciliar (silvestre) e acidental (transfusões sanguíneas, iatrogênicas e transplantes de órgãos) (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

O controle de vetores é muito utilizado nas transmissões domiciliar e peridomiciliar (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Os vetores possuem capacidade de vôo relativamente curta, não percorrendo grandes distâncias. Assim, a aplicação local de inseticidas pode ajudar no controle dos insetos em áreas bem definidas (GRIMALDI; TESH, 1993). Costa, Pereira e Araújo (1990), observaram que os processos de borrifação de inseticidas promoveram

redução da incidência acumulada de LVA no período de 1980 a 1986 no PI.

Um eficiente sistema de vigilância e a participação da população através de medidas de educação em saúde são medidas que aceleram a detecção de novos casos e assim, tratamentos para a LVA (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Grimaldi e Tesh (1993) citam que o tratamento de pessoas acometidas pouco influi no processo de controle da transmissão do parasito na natureza.

De acordo com Dye (1996), acredita-se que a incidência e prevalência da infecção em humanos não interferem na disseminação da LV entre cães, ou seja, o homem não desempenha papel importante na transmissão da infecção. Assim, além do combate ao vetor, teoricamente a diminuição de cães infectantes por eutanásia ou vacinação seria eficaz no combate à doença em humanos. Entretanto, vários fatores implicam no não funcionamento das medidas de redução do número de cães infectantes como: (1) cães nem sempre parecem estar doentes nos primeiros estágios da infecção, (2) animais assintomáticos podem ser igualmente infectantes para os vetores, (3) outros reservatórios podem servir de fonte de infecção, (4) os testes diagnósticos comumente utilizados subestimam, em geral, a prevalência da infecção canina, e (5) cães eliminados são quase que imediatamente substituídos por uma nova população que pode adquirir infecção rapidamente em áreas altamente endêmicas (COSTA; VIEIRA, 2001; DYE, 1996; TESH, 1995).

No Brasil, os programas de controle enfatizam inquérito sorológico em cães e humanos, com a eutanásia dos cães positivos. Contudo, não existem estudos que provem que esta estratégia é efetiva (ASHFORD et al., 1998). Estes últimos autores mostraram que a eliminação de cães soropositivos afeta a incidência de soroconversão nos animais temporariamente, além de poder causar diminuição da incidência em humanos. Entretanto, a transmissão da LVA permanece contínua, podendo ser devido à presença de reservatórios desconhecidos. Vieira e Coelho (1998) relataram no Brasil aumento no número de casos humanos de LVA apesar da redução das taxas de soropositividade em cães no período de 1981 a 1997. Dietze et al. (1997), relataram que os resultados de programas designados ao controle da LVA via eliminação de cães têm desapontado no Brasil. Entre 1990 e 1994, mais que 4,5 milhões de cães foram pesquisados e mais de 80.000 soropositivos foram eliminados; entretanto, a incidência em humanos aumentou 100% (DIETZE et al., 1997). Souza et al. (2008) mostraram que não houve diferença estatística significativa na incidência de LVA em crianças de 0 a 12 anos na Bahia, quando foram adotadas duas estratégias de controle: somente o combate ao vetor e este mais a triagem e a eliminação de cães infectados.

O fato de que a alta prevalência de infecção canina em áreas pobres pode anteceder ou

concorrer com epidemias humanas não é suficiente para se ter certeza de que a prática do sacrifício de cães reagentes positivos nestas áreas seja efetiva. Isto se deve ao fato de que com estes dados, não se pode precisar a ordem de transmissibilidade entre as espécies, pode-se inferir que cães são simplesmente mais suscetíveis ou o diagnóstico é mais precoce e este tipo de intervenção pode depender, para sua efetividade, de um complexo de variáveis (WERNECK, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

As constantes modificações antrópicas que vêm ocorrendo no meio ambiente rural e urbano acarretaram alterações nos padrões de transmissão da LVA. Estes processos, que se tornaram mais perceptíveis nas últimas três décadas, propiciaram a emergência da doença em áreas urbanas. Assim, torna-se fundamental a realização de estudos sobre os aspectos epidemiológicos da LVA neste novo nicho eco-epidemiológico de transmissão, a fim de que medidas de intervenção sejam adotadas de maneira mais efetiva.

O cão é considerado o principal reservatório para a *L. chagasi* nas Américas, particularmente em áreas urbanas, tendo sido associado à ocorrência de casos humanos em várias regiões. Por isso, o Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil preconiza a realização de inquéritos sobre infecção canina por *Leishmania chagasi* e posterior remoção e eliminação dos cães infectados nas áreas de maior transmissão, como estratégia de controle da doença (BRASIL, 2006).

Dado a centralidade do cão doméstico no ciclo de transmissão e às dificuldades do diagnóstico da leishmaniose visceral canina, torna-se extremamente importante o maior conhecimento da LVA neste reservatório. Em particular, considerando a reconhecida inacurácia dos testes sorológicos usualmente utilizados na prática para identificação de infecção por *L. chagasi*, o desenvolvimento de um sistema de predição para a LVC, combinando informações sorológicas e clínicas, poderia contribuir para a otimização das ações de controle. A incorporação de critérios clínicos no diagnóstico poderia trazer vantagens adicionais, uma vez que cães sorologicamente positivos e que apresentam sinais clínicos compatíveis com a doença podem conformar um conjunto de animais de maior importância epidemiológica para a transmissão.

Um aspecto adicional relacionado ao problema do diagnóstico da leishmaniose canina é o fato de que as estimativas de sensibilidade dos testes sorológicos e do próprio exame clínico usualmente tomam como padrão-ouro o exame parasitológico, reconhecidamente imperfeito em termos de sensibilidade, levando a estimativas de acurácia diagnóstica provavelmente enviesadas. Sendo assim, reveste-se de importância o estudo do desempenho diagnóstico dos diferentes testes considerando as imperfeições do exame parasitológico como padrão-ouro, o que pode ser realizado por meio de análise de classe latente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Desenvolver e validar um modelo de predição e avaliar o desempenho de testes de diagnóstico para o parasitismo por *L. chagasi* em cães.

3.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver modelo de predição de cães infectados por *L. chagasi*;
- b) Validar o modelo em outro conjunto de dados;
- c) Estimar a sensibilidade e especificidade de testes de diagnóstico por meio de um modelo de análise de classe latente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área do estudo

Teresina, capital do estado do Piauí, está localizada no centro-norte do estado e no meio norte do Nordeste brasileiro (Figuras 5 e 6), latitude sul $05^{\circ} 05' 12''$ e longitude oeste $42^{\circ} 48' 42''$. Possui temperatura média anual de 28°C e clima tropical chuvoso de savana, com período de chuvas entre dezembro e abril. Tem como bioma básico o cerrado/caatinga. Sua área é de $1.755,70 \text{ Km}^2$.

A cidade apresenta 4,34% do total de óbitos por doenças infecciosas e parasitárias e taxa de mortalidade específica por doenças transmissíveis de $41,96/100.000$ habitantes (2005) (Brasil. Ministério da Saúde/DATASUS), possui um PIB per capita de R\$ 3.903 (baixo quando comparado à cidade do Rio de Janeiro com R\$ 10.537) e sua população tem faixa etária predominante de jovens entre 15 e 19 anos (IBGE).



Figura 05 - Estado do Piauí no contexto do Brasil



Figura 06 - Cidade Teresina no contexto do estado do Piauí

4.2 Desenho e população de estudo

Foi feito um estudo transversal com cães atendidos por clínicos veterinários do Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal do Piauí, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2004, totalizando 1412 animais de idade entre 1 mês e 13 anos, com raça variada. Como procedimento de rotina padrão, todos os animais com ou sem suspeita de LVC eram submetidos a exame clínico e encaminhados para realização de testes sorológico e parasitológico para leishmaniose visceral no Laboratório de Sanidade Animal, do Setor de Doenças Parasitárias, Centro de Ciências Agrárias da UFPI.

4.3 Variáveis de estudo e coleta de dados

A realização dos exames parasitológicos, a fim de se detectar as formas amastigotas da *Leishmania sp* nos animais, foi feita a partir de três materiais biológicos distintos: aspirado de medula óssea, aspirado de linfonodo e raspado de pele.

Para a realização do mielograma, o material puncionado do osso esterno foi distribuído em 4 lâminas de microscopia para confecção de esfregaços delgados, os quais, em seguida, foram fixados com metanol e corados pelo método de Giemsa. Animais menores de três meses não tiveram a medula puncionada.

O aspirado de linfonodo foi realizado nos animais que apresentavam linfonodos hipertrofiados. O material obtido também foi distendido em lâmina de microscopia fixado com metanol e corado pelo método de Giemsa.

O raspado de pele foi feito em animais que apresentavam uma ou mais das seguintes lesões: lesão no focinho, na orelha, na matriz ungueal, despigmentação no focinho, áreas de alopecia na orelha e áreas de alopecia ao redor dos olhos. O material obtido foi distribuído em lâminas individuais em seguida fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa.

A leitura das lâminas foi feita por apenas um técnico, em microscópio óptico biocular com objetiva de imersão.

O teste sorológico foi realizado mediante a colheita de 10 mL de sangue por punção venosa com auxílio de tubos *vacuteiner*. O soro obtido foi submetido à RIFI, segundo Camargo 1969, utilizando-se o kit IFI – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIO-

MANGUINHOS. Para este teste, os soros foram diluídos com título inicial de 1:40, indo até 1:1280. A leitura do teste foi realizada em microscópio de fluorescência com objetiva de 40x, e foi realizada por dois técnicos.

Cinco veterinários foram responsáveis pela avaliação clínica dos animais no momento da recepção no hospital. Durante esta avaliação, uma ficha clínica padronizada foi preenchida pelos clínicos. Demais dados não clínicos foram coletados dos respectivos responsáveis pelos animais. As variáveis consideradas no estudo foram: sexo (masculino/feminino), idade (ordinal, 0 a 5) (até 1 ano, 1 ano, 2 anos, 3 anos, 4 a 5 anos, > 5 anos), alopecia (sim/não), alopecia periocular (sim/não), lesões de pele (sim/não), lesão na cabeça (sim/não), perda de peso/caquexia (sim/não), anorexia (sim/não), alterações nos membros posteriores (sim/não), lesões no lábio/queixo (sim/não), lesão no focinho (sim/não), fezes com sangue (sim/não), diarreia (sim/não), vômito (sim/não), epistaxe (sim/não), lesões pelo corpo (sim/não), lesão na orelha (sim/não), lesão no olho (sim/não), lesão nas patas (sim/não), aumento dos linfonodos (sim/não), onicogribose (sim/não), anemia (sim/não), resultado da sorologia – RIFI (ordinal, 0 a 4) (negativo, 1:40, 1:80, 1:160, >1:320) e resultado dos testes parasitológicos (positivo – animal positivo para pelo menos um dos testes /negativo).

4.4 Análises estatísticas

Para o desenvolvimento e validação do modelo de predição, os animais selecionados foram divididos em dois conjuntos: animais atendidos no ano de 2003 (715 animais), para criação do modelo preditivo, e animais atendidos no ano de 2004 (697 animais), para validação deste modelo. Este processo baseou-se no método *split-sample validation*, onde num conjunto da amostra o modelo é criado e em outro a sua performance é avaliada (STEYERBERG, 2009b). Para obtenção das estimativas de desempenho dos testes de diagnóstico por análise de classe latente, foram considerados apenas os animais amostrados em 2003.

Inicialmente procedeu-se a análise por meio de regressão logística univariada de todas as variáveis coletadas no ano de 2003, tendo como desfecho os resultados dos testes parasitológicos (positivo/negativo). As variáveis que apresentaram associação com o desfecho com nível de significância menor ou igual a 20% ($p \leq 0,2$) foram utilizadas no modelo multivariado, onde foram estimadas as razões de chance ajustadas e os respectivos intervalos

de 95% de confiança. Somente permaneceram no modelo final as variáveis que tiveram associação com o desfecho em nível de significância de 5%. Foram formados três modelos finais: um somente com as variáveis clínicas (modelo clínico), um somente com a variável RIFI e o outro com as variáveis clínicas e RIFI. Os parâmetros de área abaixo da curva ROC ou estatística de concordância “c” (habilidade discriminatória do modelo (STEYERBERG, 2009a), sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia global foram comparados entre os três modelos originais. A habilidade discriminatória do modelo mostra o quão bem este é capaz de discriminar animais com e sem o desfecho (*ibid*, 2009).

Para avaliar a calibração do modelo com maior poder discriminatório, foi feita a estatística de Hosmer-Lemeshow, considerando a divisão das observações em grupos de dez (HOSMER; LEMESHOW, 2000). A calibração do modelo mostra a concordância entre os desfechos observados e preditos pelo modelo.

Estes modelos foram validados, através da criação de escores, nos dados coletados no conjunto de cães do ano de 2004, processo no qual também foram comparados os parâmetros de interesse. Os escores foram calculados, a partir dos modelos originais de 2003, através da divisão do coeficiente de regressão de cada variável pelo menor coeficiente de regressão dentre estas, e o valor foi arredondado para o inteiro mais próximo (BARQUET et al., 1997).

Para obtenção dos valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos foi utilizado como ponto de corte para predição o valor de 40%, próximo à prevalência da infecção do parasito na população estudada (38,2% em 2003 e 43,6% em 2004).

Em um segundo momento utilizou-se modelos de classe latente (Anexo 2), com estimação via máxima verossimilhança, para avaliar a sensibilidade e especificidade de testes diagnóstico para LVC considerando-se que o exame parasitológico não seria um padrão-ouro apropriado, ou seja, que o real estado de doença dos indivíduos não é conhecido. Uma das premissas do modelo utilizado é de que os resultados dos testes são condicionalmente independentes ao estado de infecção do animal, isto é, a probabilidade de um animal ser positivo em dois testes, dado seu estado de infecção é dada pelo produto das probabilidades marginais de ser positivo em cada um dos testes (POUILLOT et al., 2002). Considera-se também que a acurácia dos testes é constante em todas as subpopulações consideradas, necessárias para o cálculo dos parâmetros, e que as estimativas de máxima verossimilhança são não tendenciosas e eficientes.

Os modelos de classe latente implementados consideraram três testes (sorologia – RIFI; escore clínico e exame parasitológico da medula, uma vez que todos os animais, até mesmo os sem clínica aparente, passaram por este teste) e uma população sem estado

conhecido da doença, amostrada em 2003.

O escore clínico foi calculado a partir dos resultados da regressão logística multivariada, conforme descrito anteriormente (escores variando de -5 a 16 pontos). Foram considerados dois pontos de corte do escore clínico para classificação dos cães como positivos ou negativos: para uma maior sensibilidade, animais com escore maior ou igual a 2 eram considerados positivos (“Escore 2”) e para uma maior especificidade, animais com escore maior ou igual a 3 eram considerados positivos (“Escore 3”). Em relação aos resultados da RIFI considerou-se também dois pontos de corte em que foram considerados positivos os cães com valores $\geq 1:40$ (“RIFI40”) ou $\geq 1:80$ (“RIFI80”).

Assim, foram estimadas as sensibilidades e especificidades para RIFI, escore clínico e exame parasitológico da medula em quatro situações (modelos), correspondentes aos diferentes critérios diagnósticos utilizados, a saber:

- 1) RIFI40, Escore 2 e parasitológico;
- 2) RIFI40, Escore 3 e parasitológico;
- 3) RIFI80, Escore 2 e parasitológico;
- 4) RIFI80, Escore 3 e parasitológico.

Para o cálculo dos intervalos de 95% de confiança foram feitas mil reamostragens (bootstraps) (SHAO; TU, 1995).

As análises estatísticas de regressão foram feitas com auxílio do aplicativo estatístico STATA (STATA Corp., College Station, TX). A análise de classe latente foi realizada no ambiente R 2.11.1 com o aplicativo TAGS (POUILLOT; GERBIER et al., 2002).

4.5 Aspectos éticos

Esta pesquisa é um sub-projeto do projeto de pesquisa "Testes para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina: infecção e infectividade", coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa e foi aprovado (Parecer No 026 de 15/08/2008) no Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí.

5 ARTIGOS

5.1 Artigo 1 - Fatores preditivos para o parasitismo canino por *Leishmania Chagasi* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Piauí, Teresina.

(Predictive Factors for canine parasitism by *Leishmania chagasi* in dogs assisted in Veterinary Hospital of the Piauí's Federal University, Teresina.)

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença zoonótica grave que afeta milhões de cães na Europa, Ásia, África e Américas (Moreno e Alvar, 2002). A doença nestes animais é caracterizada clinicamente por perda de peso, aumento dos linfonodos, hepatoesplenomegalia, ceratoconjuntivite, onicogribose, alopecia, dermatite, úlcera na pele, anemia e coagulopatias, sendo estas representadas principalmente por hemoptise e emaciação (Travi *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2008).

O cão é considerado o principal reservatório para a *L. chagasi* nas Américas, particularmente em áreas urbanas, tendo sido associado à ocorrência de casos humanos em várias regiões (Cabrera *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2001). Por isso, o Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil preconiza a realização de inquéritos sobre infecção canina por *Leishmania chagasi* e posterior remoção e eliminação dos cães infectados como estratégia de controle da doença nas áreas de maior transmissão (Brasil. Ministério da Saúde, 2006).

Entretanto, o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública, em particular, devido a reconhecida inacurácia dos testes sorológicos usualmente utilizados na prática para identificação de infecção canina por *L. chagasi* (Brasil. Ministério da Saúde, 2006). Mesmo com modernas técnicas moleculares e novos testes sorológicos, o diagnóstico desta doença em cães continua um desafio (Banech e Aroch, 2008). O uso de técnicas diagnósticas mais sofisticadas, principalmente técnicas moleculares, pode se tornar inexecutável na prática, pois depende de infra-estrutura adequada e recursos humanos capacitados nem sempre disponíveis nas áreas endêmicas.

Neste sentido, o desenvolvimento de um sistema de predição para LVC combinando informações sorológicas e clínicas, poderia contribuir para a otimização das ações de controle. A incorporação de critérios clínicos no diagnóstico poderia trazer vantagens adicionais, uma vez que cães sorologicamente positivos e que apresentam sinais clínicos compatíveis com a doença podem conformar um conjunto de animais de maior importância epidemiológica para a transmissão.

Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um modelo de predição para o parasitismo por *L. chagasi* em cães, baseado em resultados de testes sorológicos e sinais clínicos, objetivando fornecer subsídios para aumentar a efetividade das ações de controle da LV.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo.

Teresina, capital do estado do Piauí, está localizada no centro-norte do estado e no meio norte do Nordeste brasileiro (figura 01), latitude sul 05° 05' 12'' e longitude oeste 42° 48' 42''. Possui temperatura média anual de 28° C e clima tropical chuvoso de savana, com período de chuvas entre dezembro e abril. Tem como bioma básico o cerrado/caatinga. Sua área é de 1.755,70 Km².

Desenho e população de estudo.

Foi feito um estudo transversal com cães atendidos por clínicos veterinários do Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal do Piauí, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2004, totalizando 1412 animais de idade entre 1 mês e 13 anos, com raça variada. Como procedimento de rotina padrão todos os animais com ou sem suspeita de LVC eram submetidos a exame clínico e encaminhados para a realização de testes sorológico e parasitológico para leishmaniose visceral no Laboratório de Sanidade Animal, do

Setor de Doenças Parasitárias, Centro de Ciências Agrárias da UFPI.

Variáveis de estudo e coleta de dados.

A realização dos exames parasitológicos, a fim de se detectar as formas amastigotas da *Leishmania* sp nos animais, foi feita a partir de três materiais biológicos distintos: aspirado de medula óssea, aspirado de linfonodo e raspado de pele.

Para a realização do mielograma, o material puncionado do osso esterno foi distribuído em 4 lâminas de microscopia para confecção de esfregaços delgados, os quais, em seguida, foram fixados com metanol e corados pelo método de Giemsa.

O aspirado de linfonodo foi realizado nos animais que apresentavam linfonodos hipertrofiados. O material obtido também foi distendido em lâmina de microscopia fixado com metanol e corado pelo método de Giemsa.

O raspado de pele foi feito em animais que apresentavam uma ou mais das seguintes lesões: lesão no focinho, na orelha, na matriz ungueal, despigmentação no focinho, áreas de alopecia na orelha e áreas de alopecia ao redor dos olhos. O material obtido foi distribuído em lâminas individuais em seguida fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa.

Animais menores de três meses não tiveram a medula puncionada. Nestes animais, foi feita a punção de linfonodo, quando hipertrofiado e raspado de pele, quando com lesão.

A leitura das lâminas foi feita por apenas um técnico, em microscópio óptico biocular com objetiva de imersão.

O teste sorológico foi realizado através da colheita de 10 mL de sangue por punção venosa com auxílio de tubos vacuteiner. O soro obtido foi submetido à RIFI, segundo Camargo 1969, utilizando-se o kit IFI – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIOMANGUINHOS. Para este teste, os soros foram diluídos com título inicial de 1:40, indo até 1:1280. A leitura do teste foi realizada em microscópio de fluorescência com objetiva de 40x, e foi realizada por dois técnicos.

Cinco veterinários foram responsáveis pela avaliação clínica dos animais no momento da recepção no hospital. Durante esta avaliação, uma ficha clínica padronizada foi preenchida pelos clínicos. Demais dados não clínicos foram coletados dos respectivos responsáveis. As variáveis consideradas no estudo foram: sexo (masculino/feminino), idade (ordinal, 0 a 5) (até 1 ano, 1 ano, 2 anos, 3 anos, 4 a 5 anos, > 5 anos), alopecia (sim/não), alopecia periocular

(sim/não), lesões de pele (sim/não), lesão na cabeça (sim/não), perda de peso/caquexia (sim/não), anorexia (sim/não), alterações nos membros posteriores (sim/não), lesões no lábio/queixo (sim/não), lesão no focinho (sim/não), fezes com sangue (sim/não), diarreia (sim/não), vômito (sim/não), epistaxe (sim/não), lesões pelo corpo (sim/não), lesão na orelha (sim/não), lesão no olho (sim/não), lesão nas patas (sim/não), aumento dos linfonodos (sim/não), onicogribose (sim/não), anemia (sim/não), resultado da sorologia – RIFI (ordinal, 0 a 4) (negativo, 1:40, 1:80, 1:160, >1:320) e resultado dos testes parasitológicos (positivo – animal positivo para pelo menos um dos testes /negativo).

Análises estatísticas.

Para o desenvolvimento e validação do modelo de predição, o grupo de animais foi dividido em dois conjuntos: animais atendidos no ano de 2003 (715 animais), para criação do modelo preditivo, e animais atendidos no ano de 2004 (697 animais), para validação deste modelo (*split-sample validation*) (Steyerberg, 2009 (b)).

Inicialmente procedeu-se a análise por meio de regressão logística univariada de todas as variáveis coletadas no ano de 2003, tendo como desfecho o resultados dos testes parasitológicos (positivo/negativo). As variáveis que apresentaram associação com o desfecho com nível de significância menor ou igual a 20% foram utilizadas no modelo multivariado, onde foram estimadas as razões de chance ajustadas e os respectivos intervalos de 95% de confiança. Somente permaneceram no modelo final as variáveis que tiveram associação com o desfecho em nível de significância de 5%. Foram formados três modelos finais: um somente com as variáveis clínicas (modelo clínico), um somente com a RIFI e o outro com as variáveis clínicas e RIFI. Os parâmetros de área abaixo da curva ROC ou estatística de concordância “c” (habilidade discriminatória do modelo (Steyerberg, 2009 (a))), sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia global foram comparados entre os três modelos originais. A habilidade discriminatória do modelo mostra o quão bem este é capaz de discriminar animais com e sem o desfecho (ibid, 2009).

Para avaliar a calibração do modelo com maior poder discriminatório, foi calculada a estatística de Hosmer-Lemeshow, considerando a divisão das observações em grupos de dez (Hosmer e Lemeshow, 2000). A calibração do modelo mostra a concordância entre os desfechos observados e preditos pelo modelo.

Estes modelos foram validados por meio da aplicação de um sistema de escores nos dados coletados no conjunto de cães do ano de 2004, processo no qual também foram comparados os parâmetros de interesse. Os escores foram calculados, a partir dos modelos originais de 2003, através da divisão do coeficiente de regressão de cada variável pelo menor coeficiente de regressão dentre estas, e o valor foi arredondado para o inteiro mais próximo (Barquet *et al.*, 1997).

Para obtenção dos valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos foi utilizado como ponto de corte para predição o valor de 40%, próximo à prevalência da infecção do parasito na população estudada (38,2% em 2003 e 43,6% em 2004).

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do aplicativo estatístico STATA (STATA Corp., College Station, TX).

Aspectos éticos

A pesquisa na qual este estudo se insere foi aprovada (Parecer N° 026 de 15/08/2008) no Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí.

RESULTADOS

Dos 1412 animais do estudo, 679 eram fêmea e 733 machos. Não houve diferença significativa do parasitismo em relação ao sexo. A prevalência do parasitismo por *L. chagasi* na população total foi de 40,9%. Observou-se que houve redução do parasitismo com o aumento da idade dos animais.

Dentre as variáveis clínicas selecionadas para a análise multivariada, apenas idade, alopecia periocular, lesões de pele, perda de peso/caquexia, lesão no lábio/queixo, lesão no focinho, lesão na orelha, lesão no olho, lesão nas patas e aumento dos linfonodos permaneceram associadas significativamente com o parasitismo por *L. chagasi* no modelo final (tabela 1).

Com a inclusão da RIFI no modelo final houve alterações relativas acima de 10% na

magnitude de algumas medidas de associação entre as variáveis clínicas e o parasitismo por *L. chagasi*. A RC associada à variável lesão no lábio/queixo sofreu um aumento relativo de aproximadamente 45%. Para as variáveis lesão no focinho e aumento dos linfonodos, o aumento relativo da RC foi de 27%. A associação entre lesão na orelha e parasitismo por *L. chagasi* caiu de 6,49 para 5,65 (redução relativa de 13%) com a inserção da variável RIFI no modelo. A chance de parasitismo por *L. chagasi* mais que dobrou para cada aumento na diluição da RIFI.

O modelo final formado a partir dos dados coletados em 2003, compreendendo as variáveis clínicas e a variável sorologia, foi o de maior discriminação. Este modelo apresentou os seguintes valores: auROC 90,1%, sensibilidade 82,4%, especificidade 81,6%, VPP 73,4% VPN 88,2% e acurácia global 81,9%. A estatística de qui-quadrado entre os valores esperados e observados para calibração do modelo não foi significativa, ou seja não houve diferença significativa entre os valores observados e esperados do modelo com maior poder discriminatório ($\chi^2 = 9,27$; $p = 0,3198$). Isto ocorreu também para a validação no conjunto populacional de 2004 ($\chi^2 = 9,35$; $p = 0,3134$).

A tabela 2 mostra os valores dos escores das variáveis clínicas e da RIFI obtidos dos modelos oriundos do conjunto amostral de 2003. A aplicação destes escores na população canina de 2004 resultou numa pontuação que variou de -5 a 19, no caso apenas do critério clínico e de -5 a 34 quando também foi considerada a RIFI. Observamos que houve um aumento dos escores com a RIFI para as variáveis lesão de pele, lesão no focinho, lesão no lábio/queixo e linfonodos.

Os escores criados a partir dos modelos originais foram aplicados e comparados na amostra de 2004 (tabela 3 e figura 2). O desempenho do modelo clínico foi pior do que o modelo apenas com a RIFI para todos os parâmetros analisados. Houve, entretanto, aumento na sensibilidade e pequena redução da especificidade quando as variáveis clínicas foram consideradas conjuntamente com os resultados da sorologia. Quando comparamos a acurácia global para modelo clínico, sorologia e sorologia com modelo clínico na população de 2003 e entre as aplicações destes modelos no processo de validação na população de 2004, observamos um incremento nos valores: 75,21; 73,115; 81,91 (2003) e 70,07; 77,47; 78,42 (2004), respectivamente. A figura 3 mostra a curva ROC na amostra de validação. A área abaixo da curva foi de 0,88, valor próximo ao valor da área sob a curva no modelo desenvolvido na amostra de 2003 (0,90).

DISCUSSÃO

O estudo objetivou a criação e validação de um modelo preditivo do parasitismo por *L. chagasi* em cães. Considerando que a LVC é uma doença de laborioso controle, sendo uma das principais causas disto a falta de um método diagnóstico altamente sensível e específico, um modelo preditivo incorporando informações clínicas pode ser útil para otimizar a identificação de cães infectados e contribuir para uma maior efetividade das ações de controle da doença.

O modelo preditivo desenvolvido foi composto de variáveis clínicas descritas na literatura, características de animais com a doença, como alopecia, lesões de pele, aumento dos linfonodos e perda de peso (Travi *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2008). Este modelo apresentou discriminação e calibração satisfatórias, indicando adequação do modelo. Os valores para a área abaixo da curva ROC, que por sua vez não é influenciada pela incidência do desfecho, para o modelo original e para a aplicação do mesmo no conjunto populacional de 2004, foram parecidos, o que indica excelente discriminação (Hosmer e Lemeshow, 2000).

Apesar de não existirem dados empíricos, há relatos de que a demodicose, uma dermatite causada pelo ácaro *Demodex canis*, encontrado nos folículos pilosos dos cães, é frequentemente identificada nos animais atendidos no Hospital onde foi realizado o estudo. A demodicose canina localizada é a forma clínica mais comum e frequentemente cursa com áreas de alopecia, com descamação e eritema de graus variáveis, afetando as regiões periocular e peri-bucal dos cães (Leitão & Leitão, 2008). Neste sentido, os resultados apontando que alopecia periocular e lesões de lábio/queixo e focinho estão associados ao parasitismo por *L. chagasi* merecem ser avaliados considerando que parte destas lesões talvez não sejam manifestações clínicas próprias da LVC e sim da própria demodicose canina. Neste caso, é plausível que a associação encontrada seja uma expressão de uma baixa imunidade do animal, mais do que um resultado da própria LVC, já que as manifestações clínicas da demodicose podem estar associadas à diminuição da imunidade celular, e a infecção por *Demodex canis* ocorre na baixa imunidade do animal (Gothe, 1989; Leitão & Leitão, 2008).

O modelo clínico apresentou uma sensibilidade bem próxima da obtida pela RIFI. Assim, uma análise clínica pelo veterinário de campo poderia ser utilizada como teste de *screening* para a doença, sendo, entretanto, necessários outros testes para confirmação

diagnóstica. Ainda, apenas o resultado do critério clínico poderia ser de certa forma útil, pois animais sem os sinais clínicos utilizados para a construção do modelo clínico, teriam alta probabilidade de testarem negativo para LVC.

Observou-se que o ponto de corte adotado de 0,4, próximo à prevalência da doença na população, equivale aproximadamente à pontuação de valor 2, ou seja, animais com pontuação final maior que 2 seriam considerados positivos e abaixo, negativos. Assim, numa situação hipotética de campo, o clínico consideraria um animal positivo caso o mesmo apresentasse as seguintes condições, por exemplo: idade de quatro anos, lesão de pele, lesão no lábio/queixo e lesão no linfonodo, ou seja: $-4 + 3 + 3 + 2 = 6$. Entretanto, observou-se que, quando a RIFI é introduzida no modelo, além de provocar o aumento de alguns escores de algumas variáveis clínicas, a pontuação de classificação do animal quanto a positivo ou negativo foi modificada para o valor 8. Assim, o animal que apresentasse as mesmas condições clínicas citadas e RIFI 1:40, por exemplo, seria positivo, pois $-4 + 4 + 5 + 3 + 3 = 11$.

O modelo preditivo considerando as variáveis clínicas, além dos resultados dos títulos sorológicos, foi o que apresentou melhor desempenho discriminatório. Este modelo apresentou discriminação e calibração satisfatórias, indicando validade do mesmo.

Este resultado é de certa forma esperado, uma vez que a sorologia aumentaria a capacidade de detecção de cães positivos, pois foi observada correlação positiva entre a conversão sorológica e o parasitismo, conforme também relatado por Madeira *et al.* (2009). Isto também poderia explicar o aumento dos valores dos escores da tabela 2, quando da consideração da RIFI.

Este modelo mais completo apresentou valores similares de especificidade e VPP, maiores de sensibilidade e VPN em relação aos outros modelos.. Assim, o modelo pode se mostrar importante em áreas onde esteja ocorrendo a transmissão, mesmo em áreas com prevalência da LVC mais baixas do que a verificada nesta amostra, sendo, neste caso, de maior utilidade o seu VPN.

Uma limitação do estudo é que a detecção do parasito não pode ser encarada como teste padrão ouro. Podem ocorrer casos em que o parasito pode não ser detectado, como em cães com lesões leves ou sem lesões de pele (Brasil. Ministério da Saúde, 2006). Isto levaria a uma estimativa mais baixa da prevalência real de parasitismo na população, promovendo a subestimação da força de associação do desfecho com as lesões clínicas e sorologia. O uso de

um padrão ouro imperfeito particularmente em termos de sua sensibilidade, como seria o caso do exame parasitológico para LVC, poderia interferir no desempenho preditivo dos outros testes (clínicos e/ou sorológicos), levando potencialmente à subestimação de suas especificidades.

Os dados encontrados mostram certa utilidade de uma avaliação clínica para a predição do parasitismo, ou seja, cães com lesões como alopecia periocular, lesões de pele, perda de peso/caquexia, lesão nos lábios/queixo, lesão no focinho, lesão na orelha, lesão nos linfonodos têm maior chance de estarem parasitados pelo protozoário. No entanto, uma limitação adicional do estudo é não considerar a gravidade dos sinais clínicos e sim apenas a existência ou não dos mesmos. Segundo Travi *et al.* (2001), a gravidade dos sintomas da doença está diretamente relacionada com a capacidade de transmissão do parasito do cão para o vetor. Assim, cães com sintomas leves podem não ter tido os parasitos detectáveis, levando a redução da força da associação entre sinais clínicos e parasitismo, pois é relatado que este tipo de técnica diagnóstica tem justamente como desvantagem a baixa sensibilidade nestes animais (Reis *et al.*, 2006). Baneth e Aroch, 2008, citam que cães assintomáticos também podem representar uma população com dificuldade de isolamento parasitário, sendo que neste caso, o não isolamento seria, a princípio, o esperado. Já Madeira *et al.* (2009), mostram que o parasito pode ser isolado da pele íntegra de animais assintomáticos. Neste estudo, mostrou-se que mais de 70% dos animais que tiveram o parasita isolado da pele, não apresentavam sinais clínicos.

Doenças caninas crônicas como a leishmaniose, ehrlichiose e babesiose podem coexistir no mesmo indivíduo. Há relatos anedóticos da presença de infecção por *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFPI. Em relação ao teste sorológico e a possibilidade de reação cruzada entre os parasitos, Guillen Llera *et al.* (2002), mostram a não reação cruzada pela técnica RIFI entre soros positivos para *Leishmania infantum* e para *Ehrlichia canis*. O que também é defendido por Oliveira *et al.* (2008), para *E. canis* e *Babesia canis*. A carga da Ehrlichiose e Babesiose nesta população precisa ser investigada, pois mesmo considerando a pouca possibilidade de reações cruzadas em nível sorológico, a clínica destas doenças é semelhante, o que pode ter contribuído para o pior desempenho preditivo do critério clínico, particularmente em termos de especificidade, devido a detecção de cães com sintomas clínicos compatíveis com LVC, mas decorrentes destas outras doenças deste conjunto de cães sem LVC. Testes sorológicos baseados em antígenos recombinantes e recombinantes quiméricos podem reduzir consideravelmente a

possibilidade de reações cruzadas (Boarino *et al.*, 2005; Rosário *et al.*, 2005).

Silva *et al.* (2001) citam a importância do cão como transmissor da LVA mesmo na ausência de sinais clínicos. Por outro lado é plausível que, cães assintomáticos ou oligossintomáticos não tenham tanta importância epidemiológica na transmissão epidêmica da doença, por dificuldade de disseminação do parasito (Travi *et al.*, 2001; Michalski *et al.*, 2007). Assim, modelos preditivos baseados em sinais clínicos teriam provavelmente maior utilidade em situações epidêmicas em regiões com instalação recente da doença, para imediata tentativa de controle da enfermidade; até mesmo porque em locais de recente instalação da doença, a não resistência imune dos animais ao parasito poderia ocasionar de maneira mais clara os sinais clínicos da patogenia. Este tipo de modelo poderia ser não aplicável em regiões endêmicas, pois seriam regiões onde se observaria cães com baixa carga parasitária, decorrente de um certo grau de imunidade, sendo necessários, neste caso, testes de diagnóstico laboratoriais mais avançados para monitoria e controle da doença.

É importante ressaltar que modelos preditivos baseados em sinais clínicos devem ser delineados de acordo com a área e situação de interesse e devem ser validados nas populações em que serão aplicados. Importante que os critérios de julgamento dos sinais clínicos sejam os mesmos para a população original e para a população a ser validado o modelo. O modelo aqui proposto serve como exemplo de que modelos preditivos podem auxiliar no diagnóstico e controle de doenças. Com a natureza dinâmica das doenças infecciosas e possíveis modificações no processo natural das mesmas, os modelos podem não ser extrapoláveis para outros sistemas. Um exemplo da limitação da extrapolação de modelos preditivos pode ser citado neste estudo, pois os animais amostrados que participaram do mesmo foram selecionados em um hospital veterinário, onde a prevalência é maior que a usualmente observada numa situação de campo.

Dye *et al.* (1993), citam que há uma boa correlação entre títulos de anticorpos e infecciosidade, além de Travi *et al.* (2001), que citam a importância da clínica na disseminação da doença. Assim, a validação do modelo proposto indica que este tipo de estudo pode ser feito para a LVC a fim de que facilite na identificação de cães parasitados possivelmente transmissores e, com isso, auxiliar na adoção de estratégias de contenção da LVA, seja em nível da população canina, ou em nível ecológico da área onde reside tal população.

REFERÊNCIAS

Almeida M A O, Jesus E E V, Sousa-Attab M L B, Alves L C, Berned M E A, Attab A M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, 127, 227-232, 2005.

Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, 175, 14-15, 2008.

Barquet N, Domingo P, Cayla J A, González J, Rodrigo C, Fernández-Villadrich P, Moraga-Liop F A, Marco F, Vásquez J, Sáez-Nieto J, Casal J, Canela J, Foz M, Prognostic Factors in Meningococcal Disease. Development of a Bedside Predictive Model and Scoring System. **Journal of the American Medical Association**, 278 (6), 1997.

Boarino A, Scalone A, Griadoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, Giuffrida M G, Rosati S. Development of recombinant chimeric antigens expressing immunodominant B epitopes of *L. infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 12, 647-653, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília. 2006.

Cabrera M A A, Paula A A, Camacho L A B, Marzochi M C A, Xavier S C, Silva A V M, Jansen A M. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 45(2), 79-83, 2003.

Camargo M E, Rebonato C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 18,500-505, 1969.

Dye C, Vidor E e Dereure J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, 103, 647-656, 1993.

Gothé R. Demodicosis of dogs: a factorial disease? **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, 102, 293-297, 1989.

Guillén Llera J L, López Garcia M L, Martín Reinoso E, De Vivar González R. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, 109, 185–190, 2002.

Hosmer D W, Lemeshow S. Applied logistic regression. 2nd ed. Wiley. New York, 2000.

Leitão J P A e Leitão J P A. Demodicose canina. Artigo de Revisão. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, 103, 135-139, 2008.

Madeira M F, Figueiredo F B, Pinto A G S, Nascimento L D, Furtado M, Mouta-Confort E, De Paula C C, Bogio A, Gomes M C A, Bessa A M S, Passos S R L. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**, 87, 260–262, 2009.

Michalsky E M, Rocha M F, Lima A C V M R, França-Silva J C, Pires M Q, Oliveira F S, Pacheco R S, Santos, S L, Barata R A, Romanha A J, Fortes-Dias C, Dias E S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, 147, 67-76, 2007.

Moreno J and Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, 18, 399-405. 2002.

Oliveira T M F S, Furuta P, Carvalho D, Machado R Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania sp.*, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, 17, 7-11, 2008.

Reis A B, Martins-Filho O A, Carvalho A T, Carvalho M G, Mayrink W, França-Silva J C, Giunchetti R C, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, 81, 68–75, 2006.

Rosário E Y, Genaro O, França-Silva J C, Costa R T, Marynk W, Reis A B, Carneiro M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100, 197-203, 2005.

Silva E S, Gontijo C M F, Pacheco R S, Fiuza V O P, Brazil, R P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil; **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96(3); 285-291, 2001.

Silva M R, Marques M J, Romanha A J, Santa-Rosa I C A, Carneiro C M, Reis A B. Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area: Bom Sucesso, Minas Gerais State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 24 (2), 281-286, 2008.

Steyerberg E W. Evaluation of Performance. Cap. 15, 255-280. In: **Clinical Prediction Models: A Practical Approach to Development, Validation, and Updating**. Springer. New York, USA. 2009, 497p (a)

Steyerberg E W. Validation of Prediction Models. Cap. 17, 298-311. In: **Clinical Prediction Models: A Practical Approach to Development, Validation, and Updating**. Springer. New York, USA. 2009, 497p (b)

Travi B L, Tabares C J, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 64, 119-24, 2001.

Tabela 1 - Variáveis do modelo final preditivo dos animais amostrados em 2003 com as respectivas Razões de Chance ajustadas do parasitismo para *L. chagasi* e os IC (95%).

Variável	Modelo Clínico			RIFI e Modelo Clínico		
	RC**	(IC***)	p valor	RC**	(IC***)	p valor
Alopecia periocular						
Não	1,00			1,00		
Sim	3,94	(1,48 – 10,44)	0,006	3,69	(1,11 – 12,31)	0,034
Idade (ordinal)	0,74	(0,67 – 0,82)	<0,001 [#]	0,76	(0,67 – 0,86)	<0,001 [#]
Lesões de pele						
Não	1,00			1,00		
Sim	2,65	(1,39 – 5,05)	0,003	2,84	(1,28 – 6,30)	0,010
Perda de peso/Caquexia						
Não	1,00			1,00		
Sim	2,38	(1,26 – 4,50)	0,007	2,29	(1,07 – 4,89)	0,033
Lesão no lábio/queixo						
Não	1,00			1,00		
Sim	2,70	(1,15 – 6,34)	0,023	3,92	(1,44 – 10,67)	0,008
Lesão no focinho						
Não	1,00			1,00		
Sim	4,87	(3,29 – 7,18)	<0,001	6,19	(3,83 – 9,99)	<0,001
Lesão na orelha						
Não	1,00			1,00		
Sim	6,49	(2,87 – 14,70)	<0,001	5,65	(2,03 – 15,73)	0,001
Alterações nos linfonodos						
Não	1,00			1,00		
Sim	1,82	(1,22 – 2,70)	0,003	2,32	(1,42 – 3,78)	0,001
RIFI (ordinal)	-	-	-	2,62	(2,23 – 3,08)	<0,001 [#]

**Razão de Chance ajustada

***IC: Intervalo de 95% de Confiança

[#] p valor de tendência

Tabela 2 – Escores das variáveis clínicas e RIFI associadas ao parasitismo canino por *L. chagasi*, obtidos dos modelos oriundos do conjunto amostral de 2003.

	Modelo clínico	Modelo clínico + RIFI
Idade	-1	-1
Alopecia periocular	5	5
Perda de peso/Caquexia	3	3
Lesões de pele	3	4
Lesão no lábio/queixo	3	5
Lesão no focinho	5	7
Lesão na orelha	6	6
Lesão nos linfonodos	2	3
RIFI	-----	3

Tabela 3 – Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) seus respectivos IC (95%) no conjunto amostral de validação, utilizando como ponto de corte de 40% para declarar um cão como positivo, sendo a prevalência do parasitismo nesta população de 43,6%

	Modelo clínico (IC) %	RIFI (IC) %	Modelo clínico + RIFI (IC) %
Sensibilidade	75,33 (70,09 - 80,07)	77,96 (72,87 - 82,49)	82,57 (77,82 - 86,66)
Especificidade	65,98 (61,05 - 70,67)	77,10 (72,62 - 81,16)	75,19 (70,60 - 79,40)
VPP	63,26 (58,06 - 68,24)	72,48 (67,29 - 77,25)	72,13 (67,10 - 76,78)
VPN	77,48 (72,61 - 81,85)	81,89 (77,58 - 85,68)	84,73 (80,50 - 88,34)

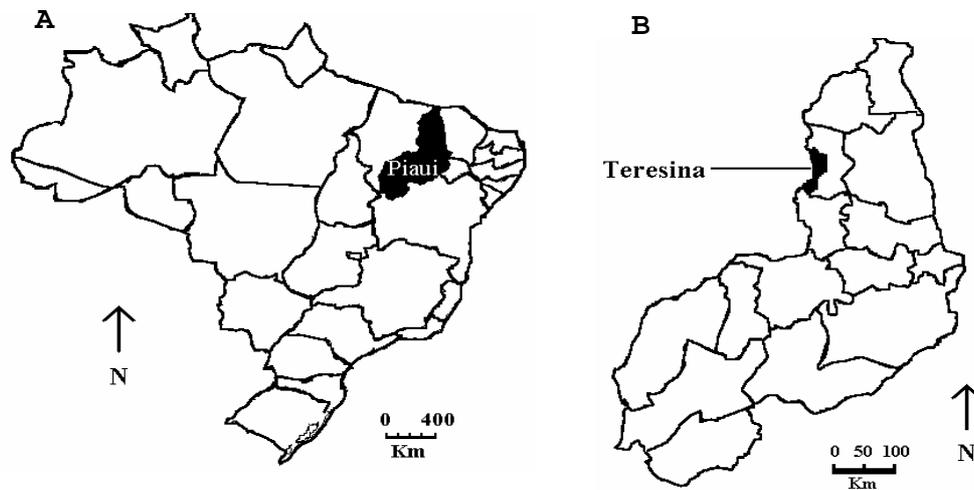


Figura 01. Estado do Piauí, Brasil e a cidade de Teresina. Brasil (A), Estado do Piauí (B)

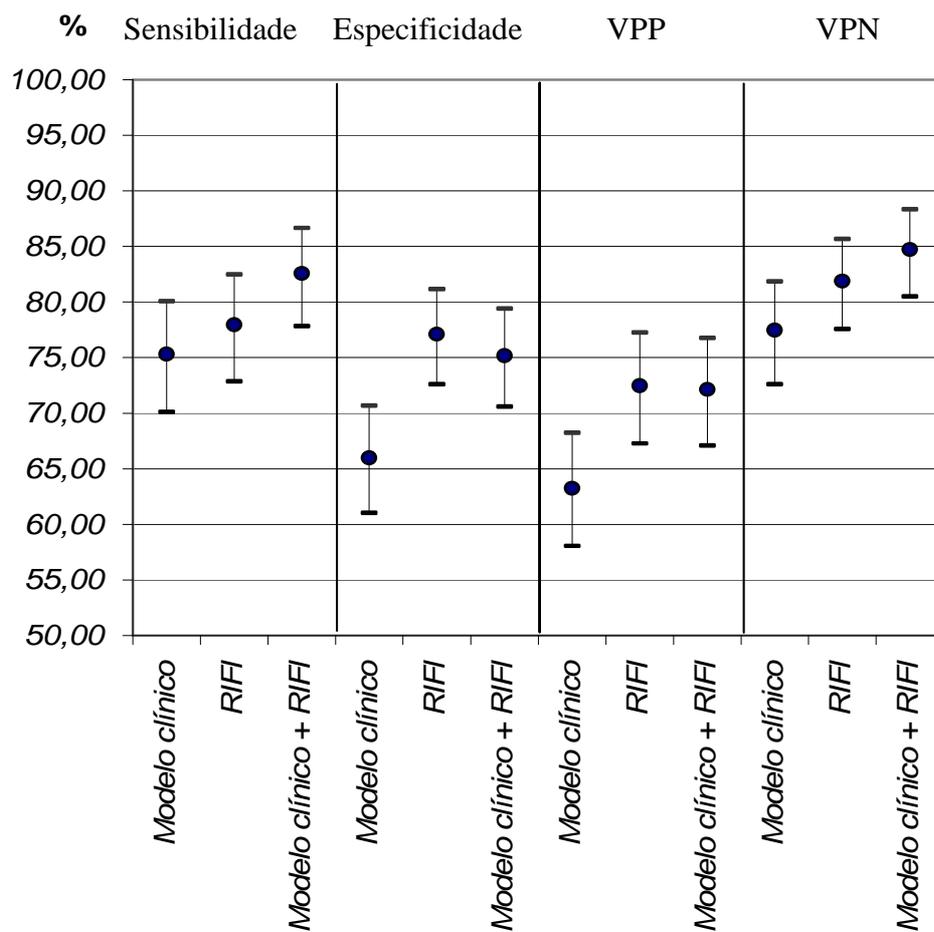


Figura 02. Representação gráfica dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) e seus respectivos IC (95%) na amostra de validação, utilizando como ponto de corte de 40% para declarar um cão positivo.

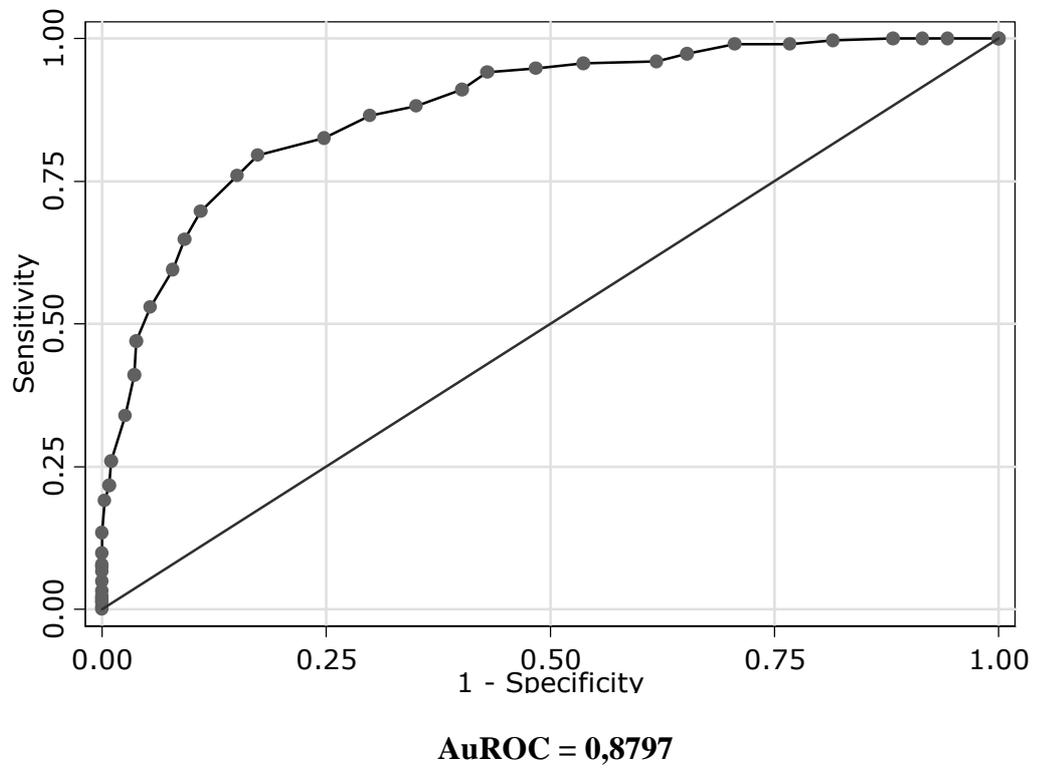


Figura 03 – Curva ROC da validação nas amostras de 2004 do modelo variáveis+RIFI criado das amostras de 2003.

5.2 Artigo 2 - Avaliação de testes de diagnóstico para Leishmaniose Visceral Canina por meio de análise de classe latente

(Evaluation of diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis diagnostic using latent class analysis)

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de referência para a leishmaniose visceral canina (LVC) no Brasil é o exame parasitológico, realizado por meio de exame microscópico direto de aspirado de tecidos (Brasil. Ministério da Saúde, 2006). Este diagnóstico possui especificidade de 100%, mas sua sensibilidade pode variar consideravelmente, dependendo da carga parasitária, material coletado, experiência do analista, tempo de leitura da lâmina, entre outros (Brasil. Ministério da Saúde, 2006) (Saridomichelakis *et al.*, 2005) (Reis *et al.*, 2006).

Um teste de diagnóstico válido é elemento chave na estratégia de controle da leishmaniose visceral canina, uma vez que o tratamento canino com drogas de uso humano é proibido no Brasil.

Assim, estudos de testes de diagnóstico que consideram como referência o teste parasitológico, podem oferecer resultados tendenciosos, uma vez que indivíduos verdadeiramente infectados, mas negativos no exame parasitológico podem promover a subestimativa da especificidade de testes de diagnóstico (Boelaert *et al.*, 1999 (a)).

A análise de classe latente (ACL) é uma técnica matemática que modela associações entre variáveis observadas que imperfeitamente medem uma variável latente ou não observada. No caso aqui apresentado, a variável latente seria a real condição do animal quanto à infecção por *L chagasi*, com duas categorias mutuamente exclusivas: infectado e não infectado. Assim, a análise modela as probabilidades de cada combinação de testes, condicionais à classe latente, promovendo estimativas de sensibilidade e especificidade para todos os testes avaliados (Boelaert, *et al.* 1999 (b)).

O objetivo deste estudo foi estimar a sensibilidade e especificidade de critérios clínicos, sorológicos e parasitológicos para detecção de infecção canina por *Leishmania chagasi* por meio de análise de classe latente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo.

Teresina, capital do estado do Piauí, está localizada no centro-norte do estado e no meio norte do Nordeste brasileiro (figura 01), latitude sul 05° 05' 12'' e longitude oeste 42° 48' 42''. Possui temperatura média anual de 28° C e clima tropical chuvoso de savana, com período de chuvas entre dezembro e abril. Tem como bioma básico o cerrado/caatinga. Sua área é de 1.755,70 Km².

Desenho e população de estudo.

Foi feito um estudo transversal com cães atendidos por clínicos veterinários do Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal do Piauí, no período de janeiro a dezembro de 2003, totalizando 715 animais de idade entre 1 mês e 13 anos, com raça variada. Como procedimento de rotina padrão todos os animais com ou sem suspeita de LVC eram submetidos a exame clínico e encaminhados para a realização de testes sorológico e parasitológico para leishmaniose visceral no Laboratório de Sanidade Animal, do Setor de Doenças Parasitárias, Centro de Ciências Agrárias da UFPI.

Variáveis de estudo e coleta de dados.

A realização dos exames parasitológicos foi feita a partir de aspirado de medula óssea. Para a realização do mielograma, o material puncionado do osso esterno foi distribuído em 4 lâminas de microscopia para confecção de esfregaços delgados, os quais, em seguida, foram fixados com metanol e corados pelo método de Giemsa. Animais menores de três meses não tiveram a medula puncionada.

A leitura das lâminas foi feita por apenas um técnico, em microscópio óptico biocular

com objetiva de imersão.

O teste sorológico, imunofluorescência indireta (IFI), foi realizado através da colheita de 10 mL de sangue por punção venosa com auxílio de tubos vacuteiner. O soro obtido foi submetido ao teste, segundo Camargo 1969, utilizando-se o kit IFI – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIO-MANGUINHOS. Para este teste, os soros foram diluídos com título inicial de 1:40, indo até 1:1280; foram considerados reativos os soros que apresentaram fluorescência na membrana dos parasitos a partir da diluição de 1:40 ou a partir da diluição de 1:80. A leitura do teste foi realizada em microscópio de fluorescência com objetiva de 40x, e foi realizada por dois técnicos.

Cinco veterinários foram responsáveis pela avaliação clínica dos animais no momento da recepção no hospital. Durante esta avaliação, uma ficha clínica padronizada foi preenchida pelos clínicos. Demais dados não clínicos foram coletados dos respectivos responsáveis pelos animais. As variáveis consideradas no estudo foram: sexo (masculino/feminino), idade (ordinal) (até 1 ano, 1 ano, 2 anos, 3 anos, 4 a 5 anos, > 5 anos), alopecia (sim/não), alopecia periocular (sim/não), lesões de pele (sim/não), lesão na cabeça (sim/não), perda de peso/caquexia (sim/não), anorexia (sim/não), alterações nos membros posteriores (sim/não), lesões no lábio/queixo (sim/não), lesão no focinho (sim/não), fezes com sangue (sim/não), diarreia (sim/não), vômito (sim/não), epistaxe (sim/não), lesões pelo corpo (sim/não), lesão na orelha (sim/não), lesão no olho (sim/não), lesão nas patas (sim/não), aumento dos linfonodos (sim/não), onicogribose (sim/não), anemia (sim/não), resultado da sorologia – RIFI (ordinal) (negativo, 1:40, 1:80, 1:160, >1:320) e resultados dos testes parasitológicos (positivo – animal positivo para pelo menos um dos testes/negativo)

Análises estatísticas.

Para derivar um critério clínico para fins diagnósticos da LVC, inicialmente procedeu-se a análise por meio de regressão logística univariada de todas as variáveis coletadas, tendo como desfecho os resultados dos testes parasitológicos (positivo/negativo). As variáveis que apresentaram associação com o desfecho com nível de significância menor ou igual a 20% foram utilizadas no modelo multivariado, onde foram estimadas as razões de chance ajustadas e os respectivos intervalos de 95% de confiança. Somente permaneceram no modelo final as variáveis que tiveram associação com o desfecho em nível de significância de 5%. Para este

modelo final de variáveis clínicas e para a variável sorologia, foram calculadas a sensibilidade e a especificidade e seus respectivos intervalos de 95% de confiança através de regressão logística, tendo como referência o teste parasitológico.

A partir do modelo clínico, foram calculados escores, através da divisão do coeficiente de regressão de cada variável pelo menor coeficiente de regressão dentre estas, e o valor foi arredondado para o inteiro mais próximo (os escores variaram de -5 a 16) (Barquet *et al.*, 1997). Foram considerados dois pontos de corte do escore clínico para classificação dos cães como positivos ou negativos: para uma maior sensibilidade, animais com escore maior ou igual a 2 eram considerados positivos (“Escore 2”) e para uma maior especificidade, animais com escore maior ou igual a 3 eram considerados positivos (“Escore 3”). Em relação aos resultados da RIFI considerou-se também dois pontos de corte em que foram considerados positivos os cães com valores $\geq 1:40$ (“RIFI40”) ou $\geq 1:80$ (“RIFI80”).

Utilizaram-se também modelos de classe latente (Anexo 2), com estimação via máxima verossimilhança, para avaliar a sensibilidade e especificidade de testes diagnósticos para LVC considerando-se que o exame parasitológico não seria um padrão-ouro apropriado, ou seja, que o real estado de doença dos indivíduos não é conhecido. Uma das premissas do modelo utilizado é de que os resultados dos testes são condicionalmente independentes ao estado de infecção do animal, isto é, a probabilidade de um animal ser positivo em dois testes, dado seu estado de infecção é dada pelo produto das probabilidades marginais de ser positivo em cada um dos testes (Pouillot *et al.*, 2002). Considera-se também que a acurácia dos testes é constante em todas as subpopulações avaliadas, o que é necessário para o cálculo dos parâmetros, e que as estimativas de máxima verossimilhança são não tendenciosas e eficientes.

Os modelos de classe latente implementados consideraram três testes (sorologia – RIFI; escore clínico e exame parasitológico - medula, uma vez que todos os animais, até mesmo os sem clínica aparente, passaram por este teste) e uma população sem estado conhecido da doença. Como o real estado de doença dos indivíduos não é sabido, a análise de classe latente fornece os valores mais prováveis dos parâmetros de interesse dos testes.

Assim, foram estimadas as sensibilidades e especificidades para RIFI, escore clínico e exame parasitológico em quatro situações (modelos), correspondentes aos diferentes critérios diagnósticos utilizados, a saber:

- 1) RIFI40, Escore 2 e parasitológico;
- 2) RIFI80, Escore 2 e parasitológico;
- 3) RIFI40, Escore 3 e parasitológico;

4) RIFI80, Escore 3 e parasitológico.

Foram feitas mil reamostragens (*bootstraps*) para o cálculo dos intervalos de 95% de confiança (Shao e Tu, 1995) para os parâmetros sensibilidade e especificidade dos testes por meio de análise de classe latente.

As análises estatísticas de regressão foram feitas com auxílio do aplicativo estatístico STATA (STATA Corp., College Station, TX). A análise de classe latente foi realizada no ambiente R 2.11.1 com o aplicativo TAGS (Pouillot and Gerbier *et al.*, 2002).

Aspectos éticos

A pesquisa na qual este estudo se insere foi aprovada (Parecer N° 026 de 15/08/2008) no Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí.

RESULTADOS

Dos 715 animais do estudo, 38,2% foram positivos para o teste parasitológico, sendo 342 fêmeas e 373 machos. Não houve diferença significativa do parasitismo em relação ao sexo. Observou-se que houve redução do parasitismo de acordo com o incremento da idade. A prevalência da doença calculada por meio da ACL variou de 0,4 a 0,42 entre os modelos.

As variáveis com significativa associação com o desfecho ($p < 0,05$) foram: alopecia periocular, idade, lesões de pele, perda de peso/caquexia, lesão no lábio/queixo, lesão no focinho, lesão na orelha e lesão nos linfonodos. A tabela 1 mostra os resultados de sensibilidade e especificidade do critério clínico e sorologia, com seus respectivos intervalos de 95% de confiança, obtidos a partir da classificação dos dados por regressão logística para a sorologia ou para as variáveis clínicas (modelo clínico), tendo como padrão-ouro o teste parasitológico. Neste caso, o critério clínico baseou-se no ponto de corte 2 e a RIFI no ponto de corte 1:40. Observamos que a RIFI mostrou-se como teste mais sensível e o teste clínico, baseado nas aplicações dos escores do modelo clínico final, mostrou-se mais específico (tabela 1).

A tabela 2 mostra os valores de sensibilidade e especificidade dos testes, considerando

os quatro modelos propostos avaliados por análise de classe latente. Observamos que em todas as combinações avaliadas por análise de classe latente, a sensibilidade e especificidade para parasitologia foram similares (figuras 2 e 3).

Observamos que houve um incremento nos valores de sensibilidade da sorologia, pela ACL, quando comparados com os valores da regressão logística, independente do ponto de corte adotado (tabela 2 e figura 2). A especificidade da sorologia manteve-se praticamente constante em relação ao valor apresentado na tabela 1, exceto quando foi aumentado o ponto de corte para 1:80, sendo que neste caso, houve um aumento deste parâmetro por ACL (tabela 2 e figura 3).

A sensibilidade do exame clínico pela ACL foi menor que o valor obtido com a regressão logística, independente do ponto de corte adotado. A especificidade sofreu um decréscimo pela ACL, no modelo menos específico e mostrou valores bem próximos aos obtidos pela regressão logística quando foi utilizado maior valor de corte pela ACL (tabela 2). Com a adoção dos diferentes pontos de corte para a clínica, observamos uma leve alteração nos valores de especificidade e sensibilidade nos diferentes modelos (figuras 2 e 3).

DISCUSSÃO

Os dados mostram que, por meio da análise de classe latente, as melhores sensibilidades estimadas para os critérios clínico, sorológico e parasitológico foram de 60%, 95% e 66%, respectivamente. Já as melhores especificidades estimadas para os critérios clínico, sorológico e parasitológico foram de 77%, 90% e 100%, respectivamente. Ambos os cálculos de prevalência, para os quatro modelos de ACL e para a regressão logística, aproximam-se dos valores encontrados por Oliva *et al.*, 2006, apesar da amostragem ter sido selecionada em hospital.

A sensibilidade do teste clínico por meio da análise de classe latente ficou entre 0,53 e 0,60, aproximadamente, dependendo do ponto de corte utilizado. Boelaert *et al.* (1999) (b), apesar de não discriminar a clínica da doença em cães para o julgamento de infectado ou não, detectou por meio da análise latente, uma sensibilidade da clínica de 0,45. Esta diferença pode se dever a um viés de seleção do estudo de Teresina, pois este foi realizado em cães amostrados em hospital e em área de alta carga parasitária, sendo maior a possibilidade da manifestação clínica compatível com a doença. Da mesma forma, comparando a

especificidade da clínica por ACL com o detectado pelo último autor (0,92), o fato de a amostragem de cães ter sido feita em hospital, pode ter levado a uma menor especificidade do teste clínico devido a detecção de cães com sintomas clínicos compatíveis com LVC, mas decorrentes de outras doenças com apresentação clínica similar dentre o conjunto de cães sem LVC.

Considerando a sensibilidade de 100%, por definição, do teste parasitológico, teste referência, observou-se uma considerável diminuição do valor deste parâmetro por ACL, corroborando os achados de Boelaert *et al.* (1999) (b). Mesmo com a amostragem em hospital, com maior probabilidade da detecção de animais doentes, a sensibilidade do teste parasitológico foi bem menor que a relatada no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006 (80%). Este teste mostrou-se com baixa sensibilidade, o que pode influenciar outros testes de diagnóstico para a doença quando utilizado como referência. Neste caso, não foram considerados de maneira separada os cães com ou sem sinais clínicos, e nem mesmo os oligossintomáticos. Podem ocorrer diferenças nas sensibilidades do exame parasitológico de acordo com a gravidade da doença e conseqüentemente de acordo com o grau de manifestação da clínica, devido à carga parasitária, principalmente em cães assintomáticos. (Chulay e Bryceson, 1983; Saridomichelakis *et al.*, 2005). Este último autor relatou que a variação da sensibilidade de aspirados de medula ou linfonodo poderia variar de 30 a 95%, aproximadamente. Isto nos traz a uma maior discussão sobre o assunto, pois ainda poder-se-ia considerar, dependendo do estudo, para a utilização do teste parasitológico como padrão-ouro, o estado clínico do animal.

Este estudo levanta o debate de que até que ponto o teste parasitológico pode ser considerado como padrão-ouro, pois com sua baixa sensibilidade, podem ocorrer erros de classificação quanto à infecção por *L. chagasi* quando outros testes forem considerados.

Merece destaque que a ACL foi baseada apenas no exame parasitológico da medula, o que pode ter influenciado a sensibilidade do teste parasitológico. A consideração do teste parasitológico em pele e linfonodo, poderia ocasionar um aumento na sensibilidade do teste parasitológico por meio da ACL, uma vez que se observou na inspeção dos dados, que 97 animais foram detectados positivos no exame parasitológico de pele ou linfonodo e negativos no exame de medula. Entretanto, houve critérios de eleição para os testes em pele (animais que apresentavam uma ou mais das seguintes lesões: lesão no focinho, na orelha, na matriz ungueal, despigmentação no focinho, áreas de alopecia na orelha e áreas de alopecia ao redor dos olhos) e linfonodo (animais que apresentavam linfonodos hipertrofiados), enquanto que

para o exame parasitológico da medula, todos os animais, com ou sem clínica, foram submetidos ao teste.

A sensibilidade e especificidade da sorologia foram sensivelmente alteradas, dependendo do ponto de corte adotado por ACL. Este teste mostrou-se o melhor em termos de sensibilidade. A diferença dos valores em relação ao ponto de corte pode permitir um direcionamento do estudo de diagnóstico, dependendo do objetivo do estudo. A alteração do ponto de corte para a sorologia altera a sensibilidade do teste de diagnóstico, conforme detectado também por Dye *et al.* (1993). Este mesmo autor não detectou alterações na especificidade do teste após as alterações dos pontos de corte, conforme foi detectado neste estudo. Entretanto, conforme relatado por este último autor, o teste sorológico pode variar entre períodos sazonais de transmissão, o que alteraria os valores de sensibilidade e especificidade do teste. Cães sem soroconversão poderiam mudar de status em épocas de transmissão e após, voltar a não converterem sorologicamente. Este dinamismo não pode ser considerado neste estudo devido ao seu delineamento transversal. Isto também pode influenciar quando os testes, principalmente o sorológico, são comparados entre estudos de desenho seccional, uma vez que fatores como a época de exposição ao vetor (que pode ter sua densidade modificada) e época do diagnóstico, podem influenciar na carga parasitária, manifestações clínicas do animal e resultados dos testes (Oliva *et al.*, 2006). Este último autor mostrou claramente que a soroconversão e o isolamento parasitário podem ter suas sensibilidades significativamente alteradas dependendo da época que os testes são feitos.

O teste RIFI possui como uma de suas limitações a menor probabilidade de soroconversão em animais em áreas endêmicas ou oligossintomáticos. Assim, o fato da amostragem ter sido feita em hospital pode ter levado a uma estimativa maior da sensibilidade da sorologia, pois pode ter induzido a seleção de animais mais doentes, com maior carga parasitária, e assim, com maior probabilidade de soroconversão (Leontides *et al.*, 2002). Este último autor, em estudo realizado em cães de área de baixa carga parasitária, detectou uma sensibilidade para RIFI de apenas 12,3%, enquanto que por PCR de 63%. Este fato corrobora a necessidade de complementação por outros testes para o diagnóstico da LVC. Testes sorológicos, incluindo ELISA com antígeno recombinante K39, podem não detectar animais logo após de infectados, ou animais assintomáticos ou oligossintomáticos, sendo necessários testes mais acurados ou retestes períodos após (Scalone *et al.*, 2002; Mettler *et al.*, 2005). Testes com antígenos derivados das formas amastigotas ou promastigotas podem ter uma melhor performance que a RIFI para estes cães (Mettler *et al.*, 2005). Assim, poder-se-ia

então, considerar o uso da RIFI em situações epidêmicas, de alta transmissão e conversão sorológica.

O teste baseado na PCR tem se mostrado mais sensível para o diagnóstico da LVC, quando comparado com a sorologia e parasitológico, na América do Sul e Europa, sugerindo que este tipo de teste pode ser indicado como padrão ouro para o diagnóstico da *Leishmania* spp (Gomes *et al.*, 2008). Mesmo que períodos diferentes de transmissão e densidade vetorial afetem os testes diagnósticos, até mesmo a PCR, este ainda mantém-se mais sensível (Oliva *et al.*, 2006). Entretanto, deve ser considerado que tecidos diferentes do animal podem mostrar diferentes resultados em termos de DNA parasitário. Apenas alguns animais podem ter o DNA do parasito detectado na medula óssea, enquanto que na pele, pode haver uma maior frequência de isolamento deste DNA (Solano-Gallego *et al.*, 2001).

Os dados revelam que tanto para sorologia quanto para a clínica, a alteração dos pontos de corte dos testes não influenciou em outro teste, mostrando certa independência. Apesar dos testes terem sido considerados independentes, existem relatos da relação entre carga parasitária e clínica da doença (Boelaert *et al.*, 1999 (b); Travi *et al.*, 2001). Neste caso, modelos de dependência poderiam ser desenvolvidos para uma análise da influência entre a clínica e o parasitismo.

Observamos também que há sensível diferença, quanto ao teste sorológico, quando ajustamos o ponto de corte para julgamento da positividade ou não do animal. Isto pode ser útil ao traçar estudos e inquéritos, pois este tipo de alteração influenciaria na classificação dos animais. Como exemplo, podemos citar que o ponto de corte 1:80 poderia ser utilizado, devido a maior especificidade, para confirmação de suspeita clínica e o ponto de corte 1:40 para programas de vigilância em cães provenientes de áreas endêmicas (Mettler *et al.*, 2005). Segundo Scalone *et al.* (2002), o ponto de corte do teste RIFI 1:40 pode induzir a erros de julgamento quando da comparação do método entre diferentes especialistas e estudos. O ponto de corte 1:80, apesar de perder alguns animais positivos, ajudaria uma maior padronização na definição de positivo ou negativo.

Observamos que a sensibilidade da sorologia foi aumentada por ACL e a especificidade manteve-se semelhante à obtida pela regressão logística. Já para o modelo clínico, observamos que a sensibilidade por ACL foi reduzida em comparação com os valores obtidos pela regressão logística e a especificidade foi reduzida para escore 2 e manteve-se próximo aos valores por regressão logística com escore 3. Em relação à sorologia, poder-se-ia especular que a sensibilidade aumentou pelo fato de que cães, mesmo sendo positivos sorologicamente, foram erroneamente classificados como negativos pelo teste parasitológico,

não considerado como padrão ouro pela ACL. A especificidade razoavelmente igual com o obtido por regressão logística, quando com ponto de corte 1:40, poderia ocorrer devido ao fato de que, cães sorologicamente positivos e erroneamente negativos no teste parasitológico, seriam em numero bem reduzido (haja vista a correlação positiva entre os testes), influenciando pouco na especificidade. A sensibilidade do critério clínico pode ter diminuído pelo fato de que animais com poucas lesões preditivas, de acordo com o modelo, seriam detectados como positivos pelo teste parasitológico, mas o escore atingido não seria suficiente para a positividade quando o teste parasitológico fosse retirado da posição de referência. Outro argumento seria que o critério clínico foi construído usando o teste parasitológico como padrão ouro, então se a sensibilidade do parasitológico é ruim, também deveria ser o caso deste critério, já que o ponto de corte utilizado se baseou no padrão de referencia imperfeito. A especificidade reduziria de valor talvez porque animais anteriormente negativos pela parasitologia, que são na verdade positivos sejam também pouco sintomáticos. Assim, um ponto de corte baixo seria ruim para a especificidade.

Apesar do total de parâmetros ser igual ao numero de graus de liberdade (7) (Pouillot *et al.*, 2002; Rutjes *et al.*, 2007), observou-se a adequabilidade dos modelos pela simples inspeção visual do total das populações observadas e esperadas, sendo que não houve resultados discrepantes (Anexo 1). A adequabilidade do modelo deve ser testada estatisticamente, principalmente quando há discrepâncias entre os valores observados e esperados; onde o teste dos resíduos também deve ser feito (Pouillot *et al.*, 2002). A princípio, os testes do estudo podem ser considerados independentes, pois são testes que se baseiam em diferentes propriedades biológicas, o que favorece ao fato da não possibilidade de avaliação estatística da adequabilidade dos modelos e dos resíduos, uma vez que o modelo é saturado (Pouillot *et al.*, 2002).

A validação de teste na ausência de um padrão ouro, usando estimativas de máxima verossimilhança, deveria considerar três testes, sendo que estes deveriam considerar o amplo espectro biológico de resposta da doença e serem aplicados a animais que representassem o espectro de indivíduos infectados e não infectados (Pouillot *et al.*, 2002). Neste ultimo caso, como todos os animais, suspeitos ou não, foram considerados, acredita-se que o este espectro tenha sido considerado.

Deve-se ressaltar que a análise de classe latente nos dá a probabilidade posterior de determinado indivíduo ser classificado como infectado ou não infectado. Obtêm-se a classificação do indivíduo de acordo com a maior probabilidade, a mais verossímil possível, sendo que esta não é infalível (Boelaert *et al.*, 1999 (a)). Um ponto que merece ser destacado

é que as variáveis clínicas consideradas basearam-se em sinais já descritos na literatura com associações com o parasitismo canino. Isto pode ter levado a uma estimativa enviesada dos parâmetros do modelo clínico (Rutjes *et al.*, 2007).

A decisão que testes fazer para diagnóstico da LVC deve considerar, além de questões intrínsecas dos testes, outros pontos como prevalência da doença, contexto dos serviços de saúde, sustentabilidade, reprodutibilidade e custo (Boelaert *et al.*, 1999 (b)).

Assim, o estudo mostrou que o uso do exame parasitológico como padrão-ouro para validação de testes diagnósticos não é apropriado e que os indicadores de acurácia dos testes avaliados são insuficientes e não justificam que eles sejam usados isoladamente para diagnóstico da infecção com a finalidade de controle da doença.

REFERÊNCIAS

Barquet N, Domingo P, Cayla J A, González J, Rodrigo C, Fernández-Villadrich P, Moraga-Liop F A, Marco F, Vásquez J, Sáez-Nieto J, Casal J, Canela J, Foz M, Prognostic Factors in Meningococcal Disease. Development of a Bedside Predictive Model and Scoring System. **Journal of the American Medical Association**, 278 (6), 1997.

Boelaert M, El Safi S, Goetghebeur E, Gomes-Pereira S, Ray D L, Stuyft P V. Latent class analysis permits unbiased estimates of the validity of DAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, 4, 395-401, 1999 (a).

Boelaert M, Aoun K, Liinevs J, Goetghebeurs E, Van Der Stuyft P. The potential of Latent Class Analysis in diagnostic test validation for canine *Leishmania infantum* infection. **Epidemiology and Infection**, 123, 499-506, 1999 (b).

Chulay J D, Bryceson A D. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 32, 475-479, 1983.

Dye C, Vidor E, Dereure J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, 103, 647-656, 1993.

Gomes Y M, Cavalcanti M P, Lira R A, Abath F G C, Alves, L C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, 175, 45-82, 2008.

Leontides L S, Saridomichelakis M N, Billinis C, Kontos V, Koutinas A F, Galatos A D, Mylonakis M E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, 109, 19-27, 2002.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 5515-5519, 2005.

Oliva G, Scalone A, Manzillo V F, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serologic, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naive Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, 44, 1318-1322, 2006.

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

Reis A B, Martins-Filho O A, Carvalho A T, Carvalho M G, Mayrink W, França-Silva J C, Giunchetti R C, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, 81, 68–75, 2006.

Rutjes A W, Reitsma J B, Coomarasamy A, Khan K S, Bossuyt P M. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. *Health Technology Assessment*, 11(50): iii, ix-51, 2007.

Saridomichelakis M N, Mylonakis M E, Leontides L S, Koutinas A F, Billinis C, Kontos V I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis

(*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 73(1),82-86, 2005.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire R R, Simpson D, Donoghue A R, Frank G R, Gradoni L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Epidemiology**, 104(4), 275-85, 2002.

Shao J, Tu D. *The Jackknife and the Bootstrap*. Springer, New York. 2002.

Solano-gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal of Clinical Microbiology**, 39 (2), 560-563, 2001.

Tabela 1 – Valores de sensibilidade e especificidade e seus respectivos IC (95%) estimados por regressão logística, utilizando como ponto de corte de 40% para declarar um cão como positivo, sendo a prevalência do parasitismo nesta população de 38,2%.

	Modelo clínico (escore 2) (%)	RIFI 1:40 (%)
Sensibilidade	69,60 (63,77 – 75,00)	76,10 (70,58 – 81,05)
Especificidade	78,91 (74,56 – 82,42)	71,27 (66,80 – 75,44)

Tabela 2 – Valores de sensibilidade e especificidade e seus respectivos IC (95%), obtidos por meio de análise de classe latente dos diferentes modelos propostos.

	Especificidade			Sensibilidade		
	Modelo clínico	Sorologia	Parasitologia	Modelo clínico	Sorologia	Parasitologia
Modelo 1 (Escore 2 RIFI 1:40)	0,71(0,65-0,77)	0,70(0,60-0,84)	1(0,98-1,00)	0,59(0,51-0,67)	0,95(0,91-0,99)	0,65(0,50-0,86)
Modelo 2 (Escore 2 RIFI 1:80)	0,73(0,68-0,78)	0,90(0,82-1,00)	1(0,97-1,00)	0,60(0,53-0,68)	0,83(0,77-0,91)	0,63(0,52-0,77)
Modelo 3 (Escore 3 RIFI 1:40)	0,76(0,71-0,82)	0,69(0,59-0,82)	1(0,98-1,00)	0,53(0,45-0,60)	0,95(0,91-1,00)	0,66(0,53-0,86)
Modelo 4 (Escore 3 RIFI 1:80)	0,77(0,72-0,82)	0,88(0,79-1,00)	1(0,96-1,00)	0,53(0,46-0,62)	0,83(0,77-0,92)	0,66(0,53-0,83)

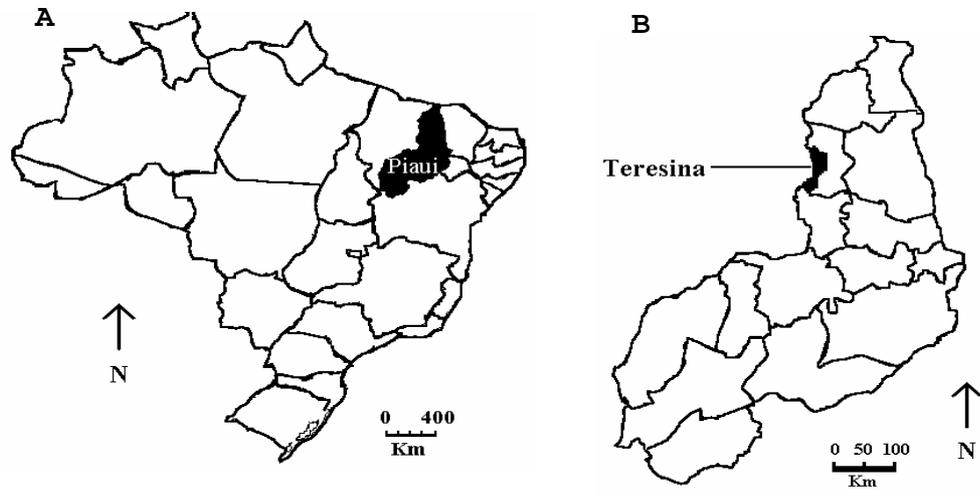


Figura 01. Estado do Piauí, Brasil e a cidade de Teresina. Brasil (A), Estado do Piauí (B)

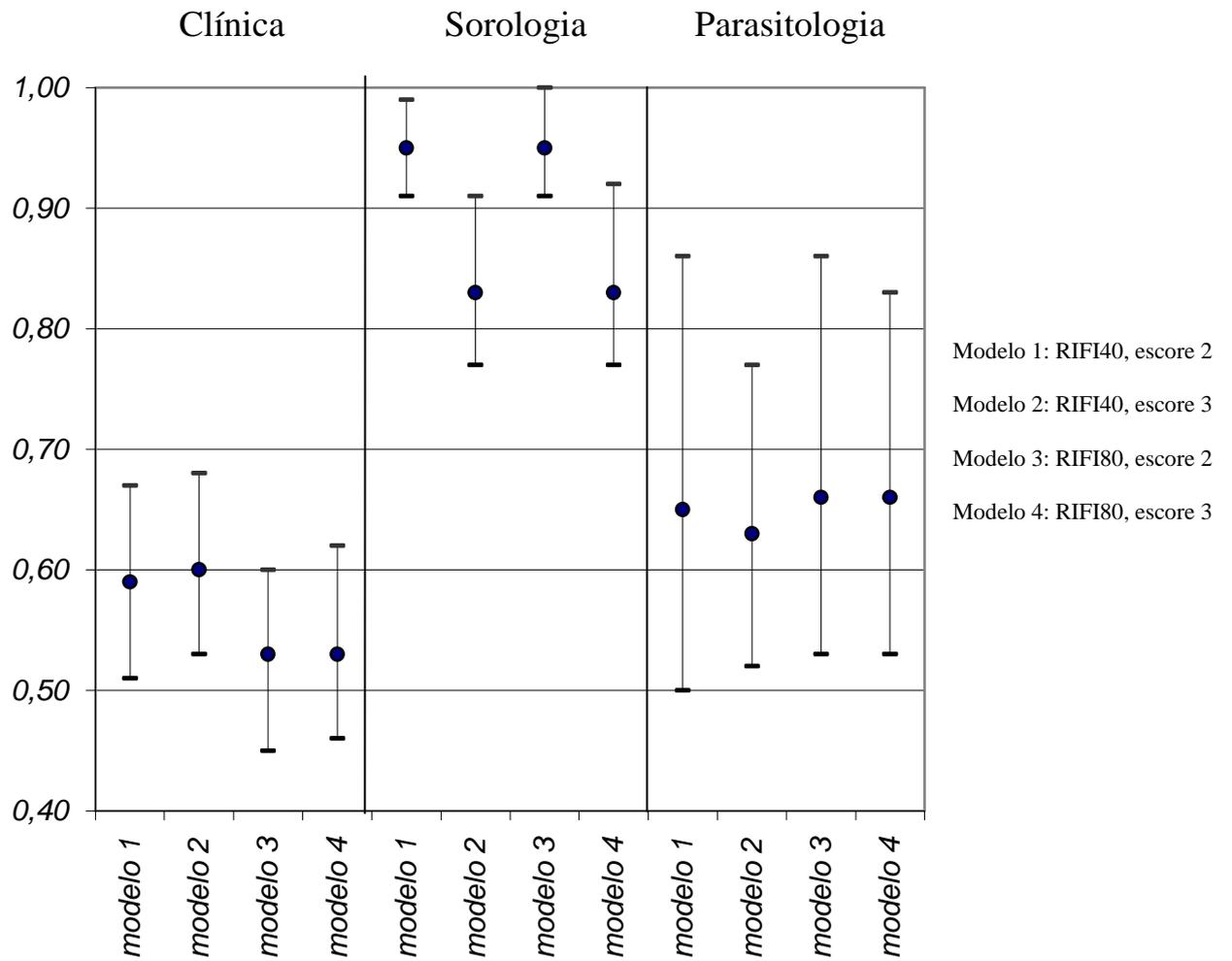


Figura 02 – Representação gráfica dos valores de sensibilidade e seus IC de 95%, obtidos por meio de análise de classe latente dos diferentes modelos propostos.

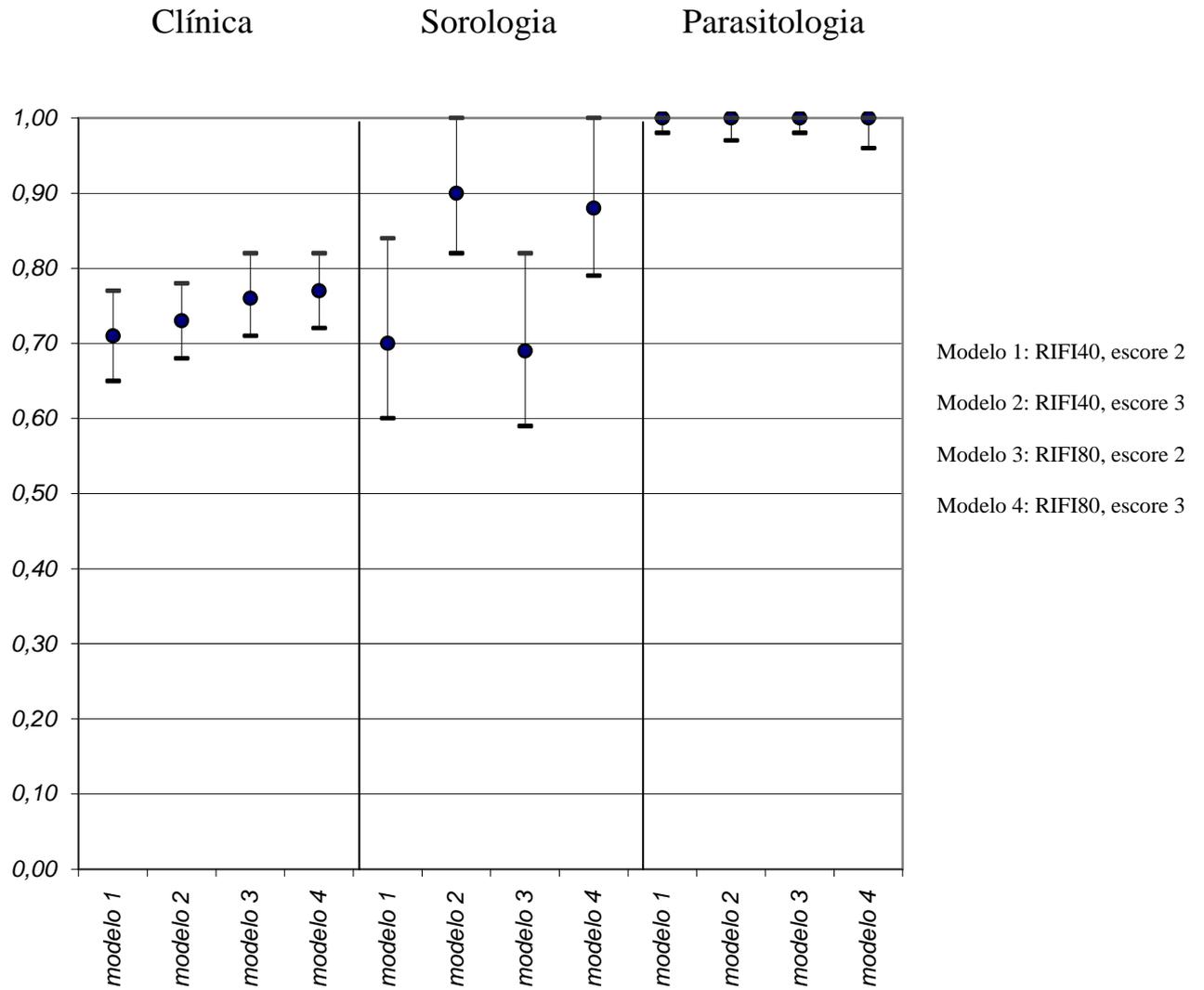


Figura 03 – Representação gráfica dos valores de especificidade e seus IC de 95%, obtidos por meio de análise de classe latente dos diferentes modelos propostos.

6 CONCLUSÕES

- O modelo preditivo desenvolvido apresentou, em sua composição, variáveis clínicas características da LVC, algumas com forte associação com o parasitismo, indicando boa possibilidade de aplicação do modelo. Assim, a avaliação clínica do veterinário, através do uso do modelo proposto, mostra-se importante quando considerada como uma primeira avaliação do animal suspeito;
- O uso do modelo clínico com a RIFI mostrou-se o mais discriminatório em relação ao desfecho (parasitismo), indicando a importância do uso concomitante das duas ferramentas. O modelo preditivo baseado na clínica e RIFI mostrou-se com especificidade próxima do valor apresentado pela RIFI, mas com maior sensibilidade. Assim, poderia ser útil em áreas de transmissão recente com manifestação clínica característica, pois apresenta alto VPN, o que auxiliaria na classificação dos animais;
- É importante que o delineamento e validação de modelos preditivos sejam feitos em populações com características de transmissão semelhantes, devido à possibilidade de extrapolação e aplicabilidade dos dados;
- A análise de classe latente mostrou que o teste parasitológico não apresenta boa sensibilidade diagnóstica, o que pode influenciar o julgamento de outros testes diagnósticos e com isso, na classificação do indivíduo;
- A RIFI, após a ACL, mostrou-se o teste mais sensível e foi o teste mais sujeito à alterações após as mudanças no ponto de corte. Isto pode ser útil quando do delineamento e propósito do teste quando usado em inquéritos sorológicos, por exemplo;
- O estudo levanta o debate do uso do teste parasitológico como teste padrão-ouro e mostra a importância do uso de mais de um método de diagnóstico, inclusive técnicas moleculares, para a classificação mais verossímil possível dos animais;
- Os indicadores de acurácia dos testes avaliados são insuficientes e não justificam que eles sejam usados isoladamente para diagnóstico da infecção com a finalidade de controle da doença.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTAB, M. L. B.; ALVES, C. L. C.; BERNED, M. E. A.; ATTAB, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, v. 127, p. 227-232, Feb. 2005.
- ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; DEN BOER, M.; CANAVATE, C.; DEDET, J. P.; GRADONI, L.; HORST, R. T.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MORENO, J. The relationship between Leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiological Reviews*, v. 21, n. 2, p. 334-359, Apr. 2008.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, n. 1, p. 259-265, jan./fev. 2004.
- ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 2, n. 2, p. 145-146, Apr./June 1996.
- ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARÓ, R. Studies on control of Visceral Leishmaniasis: impact of dog control on canine and human Visceral Leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 59, n. 1, p. 53-57, July 1998.
- ASSIS, T. S. M.; BRAGA, A. S. C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C.; COSTA, C. H. N.; COSTA, D. L.; HOLANDA, T. A.; SOARES, V. Y. R.; BIÁ, M.; CALDAS, A. J. M.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 17, n. 2, p. 107-116, jun. 2008.
- BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LORENÇO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. Jr. A prospective study of visceral Leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 154, n. 4, p. 639-649, Oct. 1986.
- BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, v. 175, p. 14-15, Jan. 2008.
- _____.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 106, n. 4, p. 315-324, July 2002.
- BARQUET, N.; DOMINGO, P.; CAYLA, J. A.; GONZÁLEZ, J.; RODRIGO, C.; FERNANDÉZ-VILLADRICH, P.; MORAGA-LIOP. F. A.; MARCO, F.; VÁSQUEZ, J.; SÁEZ-NIETO, J.; CASAL, J.; CANELA, J.; FOZ, M. Prognostic factors in meningococcal disease: development of a bedside predictive model and scoring system. *Journal of the American Medical Association*, v. 278, n. 6, p. 491-495, Aug. 1997.

BOARINO, A.; SCALONE, A.; GRIADONI, L.; FERROGLIO, E.; VITALE, F.; ZANATTA, R.; GIUFFRIDA, M. G.; ROSATI, S. Development of recombinant chimeric antigens expressing immunodominant B epitopes of *L. infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 12, n. 5, p. 647-653, May 2005.

BOELAERT, M.; AOUN, K.; LIINEVS, J.; GOETGHEBEURS, E.; VAN DER STUYFT, P. The potential of latent class analysis in diagnostic test validation for canine *Leishmania Infantum* infection. *Epidemiology and Infection*, v.123, n. 3, p. 499-506, Dec. 1999b.

_____.; EL SAFI, S.; GOETGHEBEUR, E.; GOMES-PEREIRA, S.; RAY, D. L.; STUYFT, P. V. Latent class analysis permits unbiased estimates of the validity of DAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, v. 4, n. 5, p. 395-401, May 1999a.

_____.; _____.; HAILU, A.; MUKHTAR, M.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; WASUNNA. M.; ASEFFA, A.; MBUI, J.; MENTEN, J.; DESJEUX, P.; PEELING, R. W. 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, Jan. 2008.

BOGITSH, J. B.; CHENG, T. C. *Human Parasitology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1998. p. 95-126.

BRASIL. Ministério da Saúde. *DATASUS*. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>>. Acesso em: 09 fev. 2010.

_____. _____. *Sistema de Informação de Agravos de Notificação*. Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2005. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 24 nov. 2009.

_____. _____. Coordenação-Geral de Doenças Transmissíveis. *Série histórica de óbitos e casos de doenças de notificação compulsória no Brasil: 1980-2005*. Brasília, DF. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=25340>. Acesso em: 16 nov. 2009.

_____. _____. *Vacina anti-leishmaniose visceral canina Leishmune*. Brasília, DF, 2005. Nota técnica.

_____. Portaria Interministerial nº 1426 de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, Poder Executivo, n. 133, 14 jul. 2008. Seção 1, p. 37.

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília, 2006. 122p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_viscerale2006.pdf>. Acesso em: 09 fev. 2009.

- CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M.; JANSEN, A. M. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 45, n. 2, p. 79-83, mar./abr. 2003.
- CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies: a simple inhibition procedure to ensure specific results. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 18, n. 4, p. 500-505, jul. 1969.
- CAMARGO-NEVES, V. L.; KATZ, G.; RODAS, L. A.; POLETTO, D. W.; LAGE, L. C.; SPÍNOLA, R. M.; CRUZ, O. G. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998-1999. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 17, n. 5, p. 1263-1267, set./out. 2001.
- CHULA, Y. J. D.; BRYCESON, A. D. Quantitation of amastigotes of Leishmania donovani in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 32, n.3, p. 475-479, May 1983.
- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, n. 12, p. 2959-2963, dez. 2008.
- _____.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de Leishmaniose Visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1982-1986. *Revista de Saúde Pública*, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.
- _____.; _____; PEREIRA, F. C. A.; TAVARES, J. P.; ARAÚJO, M. V.; GONÇALVES, M. J. O. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, n. 5, p. 464, Sept./Oct. 1999.
- _____.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 2, p. 223-228, mar./abr. 2001.
- _____.; WERNECK, G. L.; RODRIGUES JUNIOR, L.; SANTOS, M. V.; ARAÚJO, I. B.; MOURA, L. S.; MOREIRA, S.; GOMES, R. B. B.; LIMA, S. S. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 3, n. 3, p. 229-236, Apr. 2005.
- CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C.; CRITOSVAO, J.; NETTO, E.; JOHNSON, W. D. JR.; REED, S. G.; BADARO, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, n. 2, p. 155-158, Mar./Apr.1995.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93; n. 3, p. 239-243, May/June 2001.
- _____. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, v. 14, n. 5, p. 417-423, Sept./Oct. 1996.

- DI LORENZO, C.; PROIETTI, F. A. Leishmaniose visceral canina como fator de risco para a leishmaniose visceral humana: o que sabemos e o que não sabemos ainda. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, Suppl 3, p. 75-81, 2002.
- DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, v. 25, n.5, p. 1240-1242, Nov. 1997.
- DYE, C. The logic of Visceral Leishmaniasis control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 55, n. 2, p. 125-130, Aug. 1996.
- _____.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiology and Infection*, v. 110, n. 3, p. 647-656, June 1993.
- ELNAIEM, D. A.; SCHORCHER, J.; BENDALL, A.; OBSOMER, V.; OSMAN, M. E.; WI, A. M. M.; CONNOR, S. J.; ASHFORD, R. W.; THOMSON, M. C. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern Sudan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 68, n. 1, p. 10-17, Jan. 2003.
- FARACO, C. B.; SEMINOTTI, M. Interação homem-animal: a relação homem-animal e a prática veterinária. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, v. 10, n. 32, maio/ago. 2004.
- GAVGANI, A. S. M.; MOHITE, H.; EDRISSIAN, G. H.; MOHEBALI, M.; DAVIES, C. R. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 67, n. 5, p. 511-515, Nov. 2002.
- GOMES, Y. M.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, v. 175, n. 1, p. 45-82, Dec. 2008.
- GOMEZ, E. A.; SUD, R. A.; ESHITA, Y.; MIMORI, T.; KATAKURA, K.; HASHIGUCHI, Y. Estudios de la composición de la fauna flebotomínica y su actividad de picadura al hombre em áreas endémicas de leishmaniasis del Ecuador. In: ESTUDIOS sobre la leishmaniasis en el Nuevo Mundo y su transmisión com especial referencia al Ecuador. Kochi: Kyowa, 1998. p. 32-36. (Serie de Reportes de Investigación, nº 04).
- GOTHE, R. Demodicosis of dogs: a factorial disease? *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, v. 102, n. 9, p. 293-297, set. 1989.
- GOUVÊA, M. V.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N.; AMORIM, C. F. A. Factors associated to Montenegro skin test positivity in Teresina, Brazil. *Acta Tropica*, v. 104, n. 2-3, p. 99-107, Nov./Dec. 2007.
- GRIMALDI, G. Jr.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, n. 3, p. 230-250, July

1993.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESOSN, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infectious Disease*, v. 83, n. 8, p. 93-101, Aug. 2002.

GUILLÉN LLERA, J. L.; LÓPEZ GARCIA, M. L.; MARTIN REINOSO, E.; DE VIVAR GONZÁLEZ, R. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, v. 109, n. 3-4, p. 185-190, Nov. 2002.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. *Applied logistic regression*. 2nd ed. New York: Wiley, 2000.

IBGE. *Site das cidades*. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

IKEDA-GARCIA, F. A.; LOPES, R. S.; MARQUES, F. J.; LIMA, V. M. F.; MORINISHI, C. K.; BONELLO, F. L.; ZANETTE, M. F.; PERRI, S. H. V.; FEITOSA, M. M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, v. 143, n. 3-4, p. 254-259, Feb. 2007.

JERONIMO, S. M.; OLIVEIRA, R. M.; MACKA, Y. S.; COSTA, R. M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E. T.; LUZ, K. G.; FERNANDES, M. Z.; JERNIGAN, J.; PEARSON, R. D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, n. 4, p. 386-388, July/Aug. 1994.

KAFETZIS, D. A. An overview of paediatric leishmaniasis. *Journal of Postgraduate Medicine [serial online]*, v. 49, n. 1, p. 31-38, Jan./Mar. 2003.

KNOBEL, D. L.; LAURENSEN, M. K.; KAZWALA, R. R.; BODEN, L. A.; CLEVELAND, S. A cross-sectional study of factors associated with dog ownership in Tanzania. *BMC Veterinary Research*, v. 4, n. 5, p. 1-10, Jan. 2008.

LEITÃO, J. P. A. Demodicose canina: artigo de Revisão. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.103, p. 135-139, 2008.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary Parasitology*, v. 109, n. 1-2, p. 19-27, Oct. 2002.

LESLIE, B. E.; MEEK, A. H.; KAWASH, G. F.; MCKEOWN, D. B. An epidemiological investigation of pet ownership in Ontario. *Canadian Veterinary Journal*, v. 35, n. 4, p. 218-222, Apr. 1994.

- MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B.; PINTO, A. G. S.; NASCIMENTO, L. D.; FURTADO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; DE PAULA, C. C.; BOGIO, A.; GOMES, M. C. A.; BESSA, A. M. S.; PASSOS, S. R. L. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? *Research in Veterinary Science*, v. 87, n.2, p. 260-262, Oct. 2009.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI K, B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil: emerging Antthropozoonosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 10, supl. 2, p. 359-375, 1994.
- MEHLHORN, H.; DUBREMETZ, J. F.; FRANZ, M.; GUSTAFSON, M.; PETERS, W.; TARASCHEWSKI, H.; WALLDORF, V.; VOIGT, W. P. Morphology. In: MEHLHORN, H. *Parasitology in focus: facts and trends*. 1. ed. Berlin: Springer, 1988. p. 161-311.
- METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, Nov. 2005.
- MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. C. V. M. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary Parasitology*, v. 147, n. 1-2, p. 67-76, June 2007.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 9, p. 399-405, Sept. 2002.
- MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: PETERS, W. *The Leishmaniasis in biology and medicine*. Florida, Academic Press, 1987. p. 121-176.
- _____.; LEWIS, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R. Aspects of the micro ecology of *Leishmania*. *Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique*, v. 239, p. 31-41, 1977.
- OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, V. F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 1318-1322, Apr. 2006.
- OLIVEIRA, C. D.; MORAIS, M. H. F.; COELHO, G. L. L. M. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, n.12, p. 2953-2958, 2008.
- PENNA, H..A. Leishmaniose Visceral no Brasil. *Brasil Medico*, v. 48, p. 949-950, 1934.

- POUILLOT, R.; GERBIER, G.; GARDNER, I. A. "TAGS": a program for the evaluation of test accuracy in the absence of a gold standard. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 53, n.1-2, p. 67-81, Feb. 2002.
- REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARVALHO, A. T.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. 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, Aug. 2006.
- REY, L. *Bases da parasitologia médica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 50-90.
- ROSÁRIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; MARYNK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 2, p. 197-203, abr. 2005.
- RUTJES, A. W.; REITSMA, J. B.; COOMARASAMY, A.; KHAN, K. S.; BOSSUYT, P. M. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard: a review of methods. *Health Technology Assessment*, v. 11, n. 50, p. iii, ix-51, 2007.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L. S.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V. I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n. 1, p. 82-86, July 2005.
- SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Epidemiology*, v. 104, n. 4, p. 275-85, Apr. 2002.
- SHAO, J.; TU, D. *The jackknife and the bootstrap*. New York: Springer, 2002.
- SILVA, A. R.; VIANA, G. M.; VARONIL, C.; PIRES, B.; NASCIMENTO, M. D.; COSTA, J. M. Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30: n. 5, p. 359-368, set./out. 1997.
- SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O. P.; BRAZIL, R. P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil; *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 3, p. 285-291, abr. 2001.
- SILVA, M. R.; MARQUES, M. J.; ROMANHA, A. J.; SANTA-ROSA, I. C. A.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area: Bom Sucesso, Minas Gerais State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, n.

2, p. 281-286, fev. 2008.

SILVAKUMAN, R.; SINGH, S. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Postgraduate Medicine*, v. 49, n. 1, p. 55-60, Jan./Mar. 2003.

SOUZA, M. B.; MARZOCHI, M. C. A.; CARVALHO, R. W.; RIBEIRO, P. C.; PONTES, C. S.; CAETANO, J. M.; MEIRA, A. M. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência da leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, n. 51, p. 1991-1995, 2003.

SOUZA, V. M. M.; JULIÃO, F. S.; NEVES, R. C. S.; MAGALHÃES, P. B.; BISINOTTO, T. V.; LIMA, A. S.; OLIVEIRA, S. S.; JUNIOR E. D. M. Ensaio comunitário para avaliação da efetividade de estratégias de prevenção e controle da leishmaniose visceral humana no Município de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 17, n. 2, p. 97-109, 2008.

STEYERBERG, E. W. Evaluation of performance. In: _____. *Clinical prediction models: a practical approach to development, validation, and updating*. New York: Springer, 2009a. p. 255-280.

_____. Validation of prediction models. In: _____. *Clinical prediction models: a practical approach to development, validation, and updating*. New York: Springer, 2009b. p. 298-311

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 52, n. 3, p. 287-292, Mar. 1995.

THOMPSON, R. A.; LIMA, J. W. O.; MAGUIRE, J. H.; BRAUD, D. H.; SCHOLL, D. T. Climatic and demographic determinants of American visceral leishmaniasis in northeastern Brazil using remote sensing technology for environmental categorization of rain and region influences on leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 67, n. 6, p. 648-655, Dec. 2002.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R. B.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F. L.; BARBOSA, J. A. R.; BARBOSA, J. E. R.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 149, n. 3-4, p. 280-284, Nov. 2007.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 64, n.3-4, p. 119-24, Mar./Apr. 2001.

URIBE, S. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, n. 6, p. 729-734, 1999.

VIEIRA, J. B. F.; COELHO, G. E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, supl II, p. 85-92, 1998.

WERNECK, G. L. Calazar canino como fator de risco para a ocorrência de calazar humano: implicações para a definição de estratégias de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, Supl III, 2002.

WESTGARTH, C.; PINCHBECK, G. L.; BRADSHAW, J. W. S.; DAWSON, S.; GASKELL, R. M.; CHRISTLEY R. M. Factors associated with dog ownership and contact with dogs in a UK community. *BMC Veterinary Research*, v. 3, n. 5, p. 1-9, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Weekly Epidemiological Record*, v. 44; p.365-372, Nov. 2002.

_____. TDR. Leishmaniasis. 2009. Disponível em:
<<http://www.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>>. Acesso em: 05 mar. 2009a.

_____. Zoonoses and veterinary public health. 2009. Disponível em:
<<http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 05 mar. 2009b.

_____. Leishmaniasis. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 02 jan. 2009c.

_____. Neglected tropical diseases. 2009. Disponível em:
<http://www.who.int/neglected_diseases/en/>. Acesso em: 06 fev. 2009d.

_____. History of the Disease. 2009. Disponível em:
<http://www.who.int/leishmaniasis/history_disease/en/index.html>. Acesso em: 06 fev. 2009e.

_____. Burden of disease. 2011. Disponível em:
<<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 26 jan. 2011a.

_____. Essential leishmaniasis maps. 2011. Disponível em:
<http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html>. Acesso em: 26 jan. 2011b.

APÊNDICE - Populações observadas e esperadas nos diferentes modelos de ACL

Modelo 1

Combinação de testes			Observado	Esperado
MC	S	P		
0	0	0	172	172
1	0	0	72	72
0	1	0	107	107
0	0	1	78	78
1	1	0	2	3,24
1	0	1	6	4,76
0	1	1	62	60,76
1	1	1	88	89,24

MC: Modelo clínico

S: Sorologia

P: Parasitismo

0: negativo

1: positivo

Modelo 2

Combinação de testes			Observado	Esperado
MC	S	P		
0	0	0	251	251
1	0	0	100	100
0	1	0	61	61
0	0	1	59	59
1	1	0	10	11,64
1	0	1	19	17,37
0	1	1	57	55,37
1	1	1	81	82,63

MC: Modelo clínico

S: Sorologia

P: Parasitismo

0: negativo

1: positivo

Modelo 3

Combinação de testes			Observado	Esperado
MC	S	P		
0	0	0	185	185
1	0	0	59	59
0	1	0	119	119
0	0	1	66	66
1	1	0	3	3,8
1	0	1	5	4,2
0	1	1	72	71,2
1	1	1	78	78,8

MC: Modelo clínico

S: Sorologia

P: Parasitismo

0: negativo

1: positivo

Modelo 4

Combinação de testes			Observado	Esperado
MC	S	P		
0	0	0	266	266
1	0	0	85	85
0	1	0	71	71
0	0	1	49	49
1	1	0	13	13,72
1	0	1	16	15,28
0	1	1	66	65,28
1	1	1	72	72,72

MC: Modelo clínico

S: Sorologia

P: Parasitismo

0: negativo

1: positivo

APÊNDICE – A probabilidade da Análise de Classe Latente

Conforme adaptado de Boelaert *et al.* (1999) (b), vamos considerar os testes clínico, sorológico e parasitológico, como testes A, B e C. Os três testes apresentam-se como variáveis dicotômicas, podendo, cada teste, resultar em a, b ou c, respectivamente.

Assim, denotemos por π_a^A a probabilidade de um indivíduo resultar em negativo ou positivo, no teste A, sendo a = 1 ou 0. O mesmo para os testes B e C. Vamos denotar por X, a variável latente, não observada, que tem probabilidade t de pertencer a duas categorias mutuamente exclusivas, (animal infectado (1) ou não infectado (0), que seriam a verdadeira, mas desconhecida, classificação do animal). Assim, as probabilidades da variável latente ter certo valor t seriam $\pi_{t=1}^X$ e $\pi_{t=0}^X$.

A probabilidade de um cão apresentar um padrão de resultados π_{abct} é dada pelo produto das probabilidades do cão pertencer a uma classe latente t, ter testado a no teste A dado que ele é t, b no teste B dado que ele é t e c no teste C dado que ele é t. Assim,

$$\pi_{abct}^{ABCX} = \pi_t^X \times \pi_a^A|_t^X \times \pi_b^B|_t^X \times \pi_c^C|_t^X .$$

Mais especificamente, $\pi_0^B|_0^X$ denota a probabilidade de um cão ter resultado negativo no exame sorológico dado que ele é verdadeiramente negativo. Esta probabilidade refere-se à especificidade do teste. Então, $\pi_1^B|_1^X$ denota a sensibilidade do teste sorológico. Variando as possibilidades, é possível estimar os falsos positivos e falsos negativos dos testes.

Todos os parâmetros possíveis da equação acima podem ser estimados via máxima verossimilhança. Para isto, programas como Splus, R, Latent Gold, LEM e WinBugs podem ser utilizados (Rutjes *et al.*, 2007).