

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

**EFEITO DA ELEMINAÇÃO RÁPIDA DO
RESERVATÓRIO NA PREVALÊNCIA DO
CALAZAR CANINO NO VALE DO RIO CURU**

Marcus Davis Machado Braga

*tese
614.534
B794e
1996*

Curu

**D
614.534
B794e**

N.Cham. D 614.534 B794e
Autor: Braga, Marcus Davis Machado 19
Título: Efeito da eliminagco rápida do



541281

Ac. 11772

L DO CEARÁ

TROPICAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

**EFEITO DA ELEMINAÇÃO RÁPIDA DO
RESERVATÓRIO NA PREVALÊNCIA DO
CALAZAR CANINO NO VALE DO RIO CURU**

por

MARCUS DAVIS MACHADO BRAGA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

**Orientador: Prof. IVO CASTELO
BRANCO COELHO**

FORTALEZA-CE

1996

**EFEITO DA ELEMINAÇÃO RÁPIDA DO
RESERVATÓRIO NA PREVALÊNCIA DO
CALAZAR CANINO NO VALE DO RIO CURU**

Marcus Davis Machado Braga

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO DEPARTAMENTO
DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO REQUISITO
PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.**

Aprovado por:

Prof. Ivo Castelo Branco Coelho

Prof. José Wellington de Oliveira Lima

Profa. Yacy Mendonça de Almeida

FORTALEZA, CE - BRASIL

FEVEREIRO DE 1996

Ficha Catalográfica

BRAGA, M.D.M.

Relação entre o tempo de permanência de cães infectados pela *Leishmania (leishmania) chagasi* e a redução da prevalência do calazar canino / por Marcus Davis Machado Braga.

Fortaleza, Ceará, 1996.

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

1. Leishmaniose visceral, epidemiologia.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Nacional de Saúde pelo apoio financeiro concedido para a realização do trabalho.

A Ivo Castelo Branco Coelho pela seriedade, dedicação e paciência com que se entregou à tarefa de orientação.

A José Wellington de Oliveira Lima por ter apostado na minha capacidade de trabalho e me aberto as portas ao mundo da pesquisa.

A Tom Evans pela sugestão do tema da pesquisa.

À Margarida Maria de Lima Pompeu pelo espaço que deu às minhas dúvidas e indagações na sua já atribulada agenda.

A Haroldo Lima pela incansável busca do FAST-ELISA.

À Jania Maria Teixeira e Isabel Tavares MacAullife pelo inestimável apoio laboratorial.

À Norma Linhares e Vânia Pinheiro pela paciência no trabalho de revisão.

E finalmente, aos técnicos da Fundação Nacional de Saúde, incansáveis nas peripetivas pelo campo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Objetivos do Estudo.....	23
1.2 Modelo do Estudo.....	24
2 METODOLOGIA.....	25
2.1 Definição dos grupos.....	25
2.2 Área de estudo.....	26
2.3 Tamanho da amostra.....	27
2.4 Técnicas de laboratório.....	29
2.4.1 O antígeno.....	29
2.4.2 Coleta de sangue.....	30
2.4.3 Ensaio com imunofluorescência indireta.....	30
2.4.4 Ensaio com ELISA padrão.....	31
2.4.5 Ensaio com FAST-ELISA.....	32
2.4.6 Isolamento do parasito.....	34
2.4.7 Caracterização da cepas isoladas.....	34
2.4.8 Especificidade.....	36
3 RESULTADOS.....	37
3.1 Área de estudo.....	37
3.2 Cães estudados.....	42
3.3 Prevalências.....	42
3.4 Exame parasitológico dos cães.....	56

3.5	Especificidade.....	61
3.6	Utilização do FAST-ELISA.....	61
4	DISCUSSÃO.....	63
4.1	Concordância entre IFI e ELISA.....	63
4.2	Impacto na prevalência.....	65
4.3	Uso de FAST-ELISA.....	67
5	CONCLUSÃO.....	69
	ABSTRACT.....	70
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: População urbana e rural nos três últimos censos realizados no Estado do Ceará, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.....15
- Tabela 2: Coeficiente de Incidência por 100.000 habitantes do calazar humano na zona rural do Estado do Ceará, nos 11 anos anteriores ao último censo, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e do Programa de Controle da Leishmaniose da Fundação Nacional de Saúde.....17
- Tabela 3: Prevalência do Calazar Canino em São Luís do Curu, nos anos de 1990 e 1991, segundo dados do Programa de Controle da Leishmaniose no Estado do Ceará, da Fundação Nacional de Saúde.....20
- Tabela 4: Coeficiente de incidência por 100.000 habitantes, do calazar humano em São Luís do Curu, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e do Sistema Único de Saúde.....21
- Tabela 5: Informações relacionadas às áreas dos dois grupos de localidades, colhidas no levantamento inicial.....28
- Tabela 6: Total de cães trabalhados, examinados pelas técnicas ELISA e IFI, no início e ao final dos 10 meses, nos dois grupos de localidades estudadas em São Luís do Curu.....28
- Tabela 7: Total de prédios trabalhados com cães examinados no município de São Luís do Curu, no início e no final do estudo, nos dois grupos de localidades pesquisados.....37
- Tabela 8: Número de prédios visitados por localidade, com e sem cães, e percentuais totais, no levantamento inicial do grupo de localidades onde foi realizado o trabalho rotineiro da FNS em São Luís do Curu, com eliminação do cão realizada 80 dias após a coleta do sangue e diagnóstico pela IFI.....38

- Tabela 9: Número de prédios visitados por localidade, com e sem cães, e percentuais totais, no levantamento final do grupo de localidades onde foi realizado o trabalho rotineiro da FNS em São Luís do Curu, com eliminação do cão realizada 80 dias após a coleta do sangue e diagnóstico pela IFI.....39
- Tabela 10: Número de prédios visitados por localidade, com e sem cães, e percentuais totais, no levantamento inicial das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho proposto, com eliminação do cão determinada pela positividade ao ELISA e realizada dentro de 7 dias após a coleta do sangue.....40
- Tabela 11: Número de prédios visitados por localidade, com e sem cães, e percentuais totais, no levantamento final das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho proposto, com eliminação do cão determinada pela positividade ao ELISA e realizada dentro de 7 dias após a coleta do sangue.....41
- Tabela 12: Resultados comparativos dos exames realizados no sangue canino pelos dois testes, ELISA e IFI, no levantamento inicial das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho rotineiro da FNS, com eliminação do cão determinada pela positividade à IFI e realizada 80 dias após a coleta do material.....44
- Tabela 13: Resultados comparativos dos exames realizados no sangue canino pelos dois testes, ELISA e IFI, no levantamento final das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho proposto, com eliminação do cão determinada pela positividade ao ELISA e realizada dentro de 7 dias após a coleta do materia.....45
- Tabela 14: Resultados comparativos dos exames realizados no sangue canino pelos dois testes, ELISA e IFI, no levantamento final das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho rotineiro da FNS, com eliminação do cão determinada pela positividade à IFI e realizada 80 dias após a coleta do material.....45

Tabela 15: Resultados comparativos dos exames realizados no sangue canino pelos dois testes, ELISA e IFI, no levantamento final das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho proposto, com eliminação do cão determinada pela positividade ao ELISA e realizada dentro de 7 dias após a coleta do material.....	47
Tabela 16: Cães positivos examinados pelo ELISA, no início e no final da pesquisa, nos dois grupos de localidades estudados de São Luís do Curu, e decréscimo final da prevalência em cada grupo de localidades.....	48
Tabela 17: Cães positivos examinados pela IFI, no início e no final da pesquisa, nos dois grupos de localidades estudadas de São Luís do Curu, e decréscimo final da prevalência em cada grupo de localidades.....	50
Tabela 18: Aproximação dos resultados no início da pesquisa. Percentual de coincidência entre ELISA e IFI nas localidades de São Luís do Curu trabalhadas segundo a rotina da FNS, com eliminação do cão 80 dias depois da coleta do sangue e diagnóstico de positividade fornecido pela IFI.....	52
Tabela 19: Aproximação dos resultados no início da pesquisa. Percentual de coincidência entre ELISA e IFI nas localidades de São Luís do Curu trabalhadas segundo o proposto, com eliminação do cão dentro de 7 dias depois da coleta do sangue e diagnóstico de positividade fornecido pelo ELISA.....	52
Tabela 20: Aproximação dos resultados no final da pesquisa. Percentual de coincidência entre ELISA e IFI nas localidades de São Luís do Curu trabalhadas segundo a rotina da FNS, com eliminação do cão 80 dias depois da coleta do sangue e diagnóstico de positividade fornecido pela IFI.....	54
Tabela 21: Aproximação dos resultados no final da pesquisa. Percentual de coincidência entre ELISA e IFI nas localidades de São Luís do Curu trabalhadas segundo o proposto, com eliminação do cão dentro de 7 dias depois da coleta do sangue e diagnóstico de positividade fornecido pelo ELISA.....	54

Tabela 22: Aproximação global dos resultados. Coincidência entre ELISA e IFI em todas as localidades de São Luis do Curu nos dois tempos da pesquisa.....	56
Tabela 23: Resultado das culturas para <i>Leishmania</i> realizadas em cães positivos ao teste ELISA de ambos os grupos de localidades pesquisadas em São Luís do Curu, a partir de biópsia do fígado, baço, sangue e gânglios linfáticos.....	57
Tabela 24: Resultado dos testes ELISA e IFI realizados em cães com cultura de fígado, baço, sangue ou gânglios linfáticos positivos em pelo menos uma das amostras, dos dois grupos de localidades pesquisados em São Luís do Curu.....	58
Tabela 25: Resultados comparados dos testes ELISA e IFI com a cultura positiva para <i>Leishmania</i> , e respectivos percentuais de concordância.....	59
Tabela 26: Percentual de aproximação dos resultados. Exames coincidentes entre cultura positiva para <i>Leishmania</i> e teste ELISA.....	60
Tabela 27: Percentual de aproximação dos resultados. Exames coincidentes entre cultura positiva para <i>Leishmania</i> e teste IFI.....	60
Tabela 28: Soros de cães de área não endêmica, testados para as técnicas ELISA e IFI.....	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: População urbana e rural nos três últimos censos realizados no Estado do Ceará, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.....16
- Figura 2: Coeficiente de incidência por 100.000 habitantes do calazar humano na zona rural do Estado do Ceará, nos 11 anos anteriores ao último censo, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e da Campanha de Controle da Leishmaniose da Fundação Nacional de Saúde.....18
- Figura 3: Coeficiente de incidência por 100.000 habitantes do calazar humano em São Luís do Curu, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e do Serviço Único de Saúde.....22
- Figura 4: Percentuais de cães positivos avaliados pelo ELISA, iniciais e finais, nos dois grupos de localidades estudados de São Luís do Curu, e percentuais de redução final.....49
- Figura 5: Percentuais de cães positivos avaliados pela IFI, iniciais e finais, nos dois grupos de localidades estudadas de São Luís do Curu, e percentuais de redução final.....51
- Figura 6: Concordância dos resultados positivos entre o teste ELISA e IFI no início e no final da pesquisa, nos dois grupos de localidades trabalhadas em São Luís do Curu.....53
- Figura 7: Concordância dos resultados negativos entre o teste ELISA e IFI no início e no final da pesquisa, nos dois grupos de localidades trabalhadas em São Luís do Curu.....55
- Figura 8: Resultado das culturas para *Leishmania* realizadas em cães positivos ao teste ELISA de ambos os grupos de localidades pesquisadas em São Luís do Curu, a partir de biópsia do fígado, baço, sangue e gânglios linfáticos.....57
- Figura 9: Percentuais de concordância dos testes ELISA e IFI positivos nos soros com resultado de cultura positiva de fígado, baço, sangue e gânglios linfáticos dos mesmos animais.....59

RESUMO

O presente trabalho propõe outros métodos sorológicos para substituir a atual prática com imunofluorescência indireta (IFI), baseado em dados operacionais da Fundação Nacional de Saúde, órgão do Ministério da Saúde do Brasil, no combate à leishmaniose visceral no Estado do Ceará. Analiza a aplicabilidade dos testes *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e *Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay* (FAST-ELISA) como métodos diagnósticos de massa para o calazar canino no Estado, propondo a agilização da eliminação dos cães infectados, e a partir da maior sensibilidade destes métodos, a eliminação de maior número de cães contaminados. Compara a execução do trabalho rotineiro da Fundação Nacional de Saúde, em zona endêmica, com o proposto, em escala experimental, em dois grupos com o mesmo número de localidades (quatorze), do mesmo município (São Luís do Curu). Durante dez meses, acompanha a prevalência da leishmaniose visceral canina na região, avaliando-a pelo teste ELISA, no início e no fim do período. Enquanto nas localidades onde a rotina foi realizada observou-se um decréscimo de 9% na prevalência, nas localidades onde se efetuou o trabalho proposto, a redução foi de 26,37%. No primeiro caso, os animais examinados pelo teste de IFI foram mortos 80 dias após a coleta do sangue. No segundo caso, a eliminação dos cães foi determinada pela positividade ao teste ELISA, e realizada dentro de 7 dias após a coleta. O autor constata ainda dificuldades práticas na aplicação da técnica FAST-ELISA, quando realizada em condições de campo no momento atual e no Estado do Ceará.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral, calazar, Kalazar ou febre negra, como é conhecida na Índia, é uma pan-endemia das regiões tropicais e sub-tropicais do globo terrestre, coincidindo com a distribuição geográfica de diversas espécies de flebótomos. É basicamente uma parasitose pelo complexo *L. donovani*, como classifica a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1990), no organismo humano, onde se instala nas células do sistema fagocítico mononuclear. Clinicamente, caracteriza-se principalmente por sua longa duração, febre irregular durante quase todo o curso da doença, hepato-esplenomegalia, emagrecimento, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (Alencar et al., 1991). Acomete principalmente a faixa etária até os 15 anos, apresentando em Jacobina, no Brasil, uma prevalência de 3,1% e uma incidência anual de 4,3 casos por 1.000 crianças (Badaró et al., 1986). Altamente letal, 86% dos casos vão a óbito quando não tratados, e mesmo com tratamento, o coeficiente de mortalidade é de 26% (Alencar et al., 1991).

Doença metaxênica, tem características próprias em cada região (Alencar et al., 1991). Enquanto que na Índia seu principal reservatório é o próprio homem (Christopher, 1925), nas outras regiões comporta-se como uma zoonose, tendo o cão doméstico como o principal reservatório (Alencar, 1961). Deane & Deane (1955) encontraram também a raposa infectada, e alguns autores incriminaram vários outros animais como roedores (Gradoni et al., 1983) e marsupiais (Sherlock et al., 1984) de diversas espécies (Travi et al., 1994). Além dos flebótomos, outros insetos hematófagos funcionam como vetores, e carrapatos têm sido implicados, principalmente na transmissão entre cães (Amato & Nicodemo, 1991).

Nas Américas, 90% dos casos são encontrados no Brasil, e destes, o Estado do Ceará contribue com 66,7% (Alencar et al., 1991). Em todo o país, tem distribuição geográfica coincidente com a da *Lutzomyia longipalpis* (Deane & Deane, 1962), seu principal vetor

(Sherlock & Guitton, 1969), dominando todos os estados litorâneos (Alencar et al., 1991) e principalmente a região nordeste (Amato & Nicodemo, 1991). Exclusivamente a fêmea do flebótomo é hematófaga. Ao picar o hospedeiro para alimentar-se, ingere células histiocitárias e mononucleares (Ridley, 1987) infectadas com formas amastigotas arredondadas e aflageladas, as quais se rompem no tubo digestivo intermediário do inseto, liberando o parasito. As formas amastigotas originam formas promastigotas fusiformes e flageladas (Alencar et al., 1991). Até o terceiro dia depois do repasto do inseto, estas formas proliferam rapidamente e ainda não são capazes de infectar o homem (Sacks e Perkins, 1984). A infectividade somente se apresenta após o desaparecimento do sangue do aparelho digestivo do vetor, justamente quando êle sente novamente necessidade de alimentar-se (Sacks e Perkins, 1985). Interagindo com as secreções do intestino do inseto e com resíduos alimentares da sua alimentação regular (Schlein, 1993), especialmente carboidratos que impedem a aglutinação das lecitinas da membrana (Molyneux et. al., 1984), as formas sofrem alterações no maior glicoconjugado de superfície de membrana, o lipofosfoglican (LPG). Passam então de formas pro-cyclicas para metacyclicas (Schlein, 1993), infectantes, que se localizam no divertículo esofágico (Molyneux et. al., 1984). Tais formas permanecem presentes entre 9 e 30 dias após o repasto (Amato & Nicodemo, 1991). Quando infectantes perdem a capacidade proliferativa (Sacks e Perkins, 1984) e se são então inoculadas na pele de um novo hospedeiro (Alencar et al., 1991) passam a provocar infecção. A saliva do inseto, que é inoculada junto com o sangue, exerce um importante papel na progressão da infecção (Titus & Ribeiro, 1988). Tal importância parece residir fundamentalmente em um efeito vasodilatador provocado por um peptídeo nela presente (Ribeiro et al., 1989). Os parasitos sofrerão, a seguir, a ação agressiva do sistema complemento de neutrófilos e eosinófilos, sobrevivendo quando fagocitadas por macrófagos inativados. Normalmente, estas células inativadas não têm ainda desenvolvido seu mecanismo oxidativo, principal agente destruidor intracelular. Além disso, parece haver também, nesta susceptibilidade, uma tendência determinada geneticamente (Pearson, 1995).

A estratégia de controle do calazar tem se baseado principalmente no combate ao vetor, através da borrifação de inseticida no peridomicílio, e pela eliminação do cão doméstico infectado (Deane e Deane, 1954) (Alencar, 1961), (Brasil, 1994), seu reservatório mais importante. Atualmente, frente ao incremento da doença como infecção oportunística em pacientes com vírus da imunodeficiência humana em área urbana, outras estratégias tenham sido propostas para o controle dos cães domésticos, como o desenvolvimento de pesquisa por vacinas eficazes (Tesh, 1995).

A leishmaniose visceral é endêmica no Estado do Ceará. Desde 1953 casos da doença vêm sendo registrados em nossa terra. Estudos realizados naquela época demonstraram que o cão doméstico apresentava-se naturalmente infectado, com percentuais bastante elevados, e que havia uma estreita associação geográfica entre a prevalência da doença no cão e a ocorrência no homem (Deane & Deane, 1955). Em 1954, Deane & Deane encontraram *Lutzomya longipalpis* naturalmente infectada e demonstraram que este psicodídeo existia numa densidade bastante elevada no intra e peridomicílio de áreas endêmicas de leishmaniose visceral (Deane & Deane, 1954). Em 1953, o Ministério da Saúde do Brasil criou a “Campanha Contra a Leishmaniose Visceral”. Este programa baseava-se na identificação e eliminação dos cães portadores de leishmaniose visceral (Deane e Deane, 1955) (Alencar e Cunha, 1963) e em algumas áreas foi aplicado o DDT no intra e peridomicílio (Deane et al., 1955). Este programa teve atuação até o ano de 1964. De 1953 a 1958 o diagnóstico da leishmaniose visceral do cão era feito através da demonstração de formas amastigotas do parasito em esfregaços de pele, fígado e baço (Alencar & Cunha, 1963). Em 1959, foi introduzido o teste sorológico com eluato de sangue através da reação de fixação do complemento (Cunha et al., 1963). Estas duas técnicas tornaram possível a realização de inquéritos em larga escala. Os resultados obtidos pela “Campanha de Combate ao Calazar no Ceará” foram bastante significativos (Alencar et al., 1975). No período de 1964 a 1978, casos humanos esporádicos de leishmaniose visceral continuaram sendo registrados em várias regiões do Estado, mas a partir de 1979 a incidência começou a aumentar, e em 1983 apresentava taxas muito

semelhantes àquelas encontradas em 1953. Em 1981, a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) do Ministério da Saúde, hoje Fundação Nacional de Saúde (FNS), reiniciou as atividades de controle da leishmaniose visceral (FNS, 1995). No Estado do Ceará, o programa de combate à doença, desenvolvido pela FNS, se baseia na identificação e eliminação de cães portadores de leishmaniose visceral. A coleta de sangue é feita em papel de filtro, sendo realizado teste sorológico do eluato através de imunofluorescência indireta (IFI) (Brasil, 1994). Neste Estado, não tem sido usado inseticida sistematicamente desde 1981, nesta segunda fase do Programa de Controle da Leishmaniose. Há três anos que o programa cobre toda a área endêmica do Estado, e desde seu início, em 1981, até 1991, foram realizados 1.265.064 exames de cães e eliminados 31.157 cães positivos (FNS, 1995).

O Estado do Ceará apresentou uma população rural decrescente ao longo da década de 80. Entretanto, ela ainda representa 34,81% da população do Estado no ano de 1991, segundo o Anuário Estatístico do Brasil do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1992) (Tabela 1, Figura 1). Nesta população, a incidência (Rouqueiro, 1993) média do calazar foi de 10,08 por 100.000 habitantes, segundo dados da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (Ceará, 1992) e do IBGE (IBGE, 1992) (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 1: População urbana e rural nos três últimos censos realizados no Estado do Ceará, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

POPULAÇÃO	A N O		
	1970	1980	1991
Urbana	1.780.093	2.819.351	4.158.059
Rural	2.581.510	2.477.902	2.204.561
Total	4.361.603	5.297.253	6.362.620

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil, 1992.

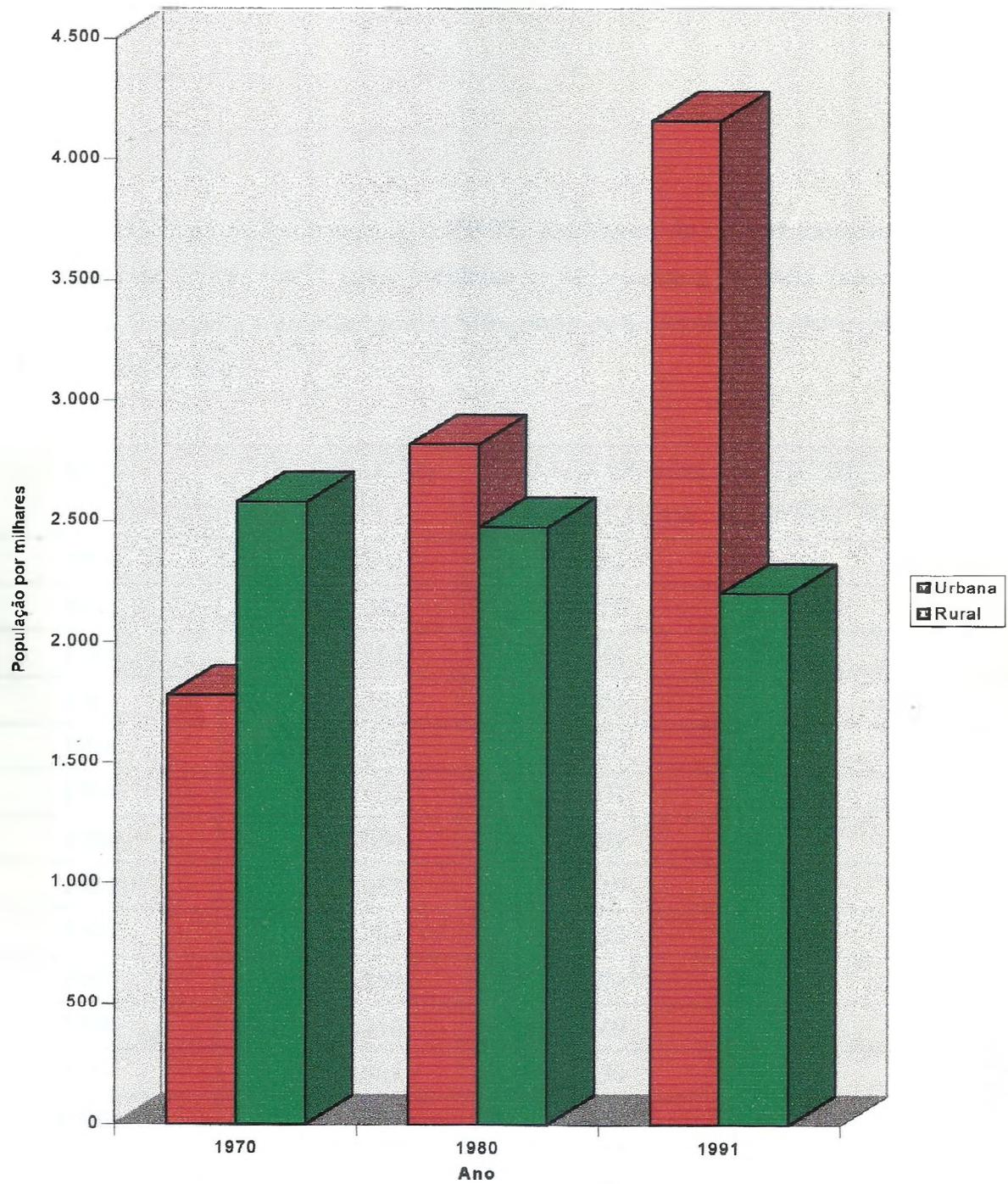


Figura 1: População urbana e rural nos três últimos censos realizados no Estado do Ceará, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil, 1992.

Tabela 2: Coeficiente de Incidência por 100.000 habitantes do calazar humano na zona rural do Estado do Ceará, nos 11 anos anteriores ao último censo, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e do Programa de Controle da Leishmaniose da Fundação Nacional de Saúde.

ANO	POPULAÇÃO	CASOS NOVOS DE CALAZAR	INCIDÊNCIA POR 100 MIL HABITANTES
1980	2.477.902	82	3
1981	2.453.052	17	7
1982	2.428.203	444	18
1983	2.403.354	439	18
1984	2.378.505	293	12
1985	2.353.656	471	20
1986	2.328.806	259	11
1987	2.303.957	119	5
1988	2.279.108	113	4
1989	2.254.259	170	7
1990	2.229.410	140	6
1991	2.204.561	150	6
Média	–	–	10

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil, 1992. Fundação Nacional de Saúde. Relatório Anual (1980 a 1995) do Programa de Controle da Leishmaniose, 1995.

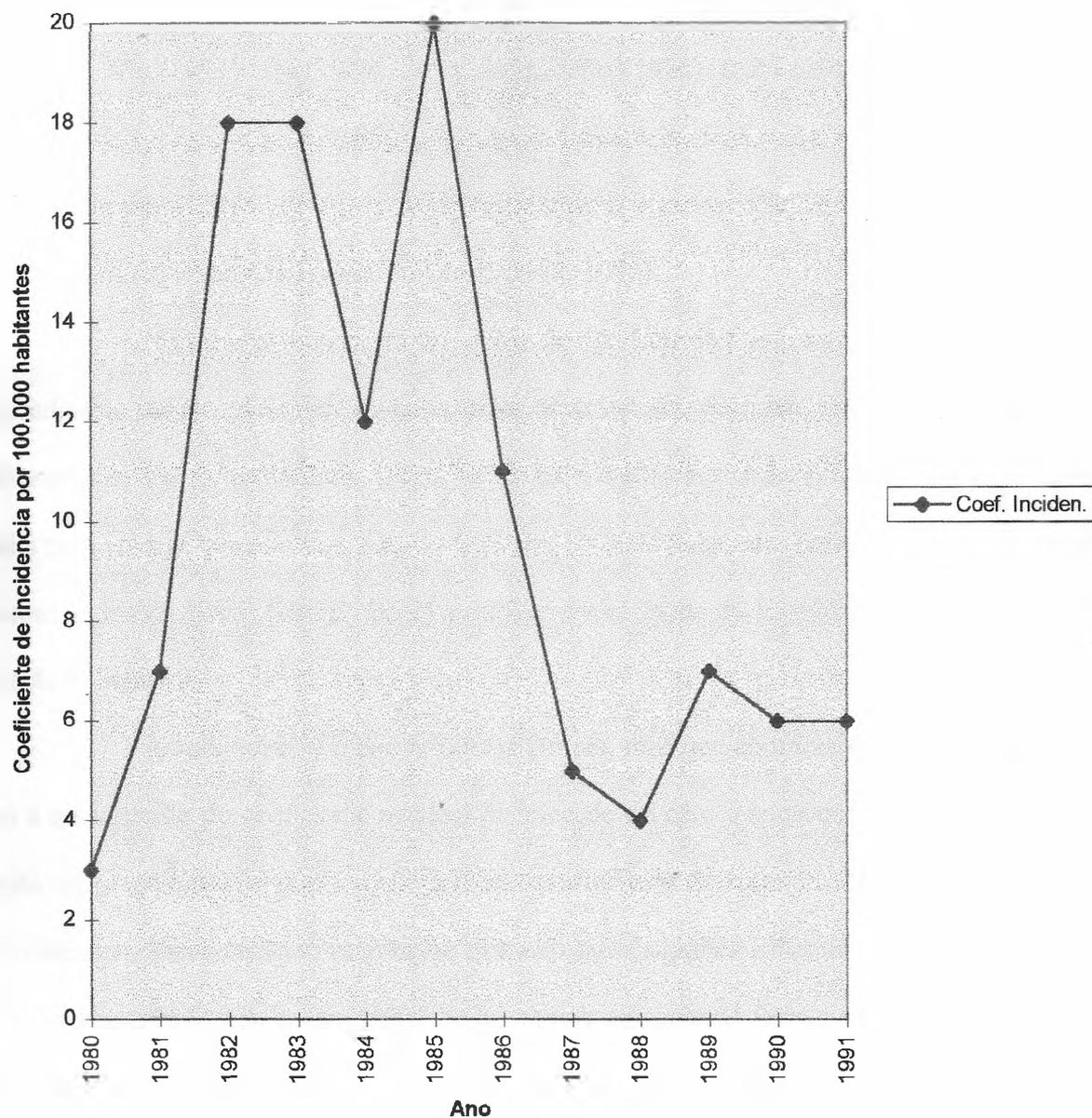


Figura 2: Coeficiente de Incidência por 100.000 habitantes do calazar humano na zona rural do Estado do Ceará, nos 11 anos anteriores ao último censo, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e da Campanha de Controle da Leishmaniose da Fundação Nacional de Saúde.

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil, 1992. Fundação Nacional de Saúde. Relatório Anual (1980 a 1995) do Programa de Controle da Leishmaniose, 1995.

O impacto da eliminação de cães infectados na prevalência do calazar canino foi mais acentuado nos primeiros anos do programa e depois estabilizou em baixas taxas de prevalência (FNS, 1995). Por exemplo, o município cearense de Hidrolândia, com uma população média de 1.890 cães, apresentou as seguintes prevalências no período de 1981 a 1990: 16% (1981), 8% (1982), 8% (1983), 5% (1984), 2% (1985), 0,5% (1986), 0,5% (1988), 0,6% (1990). Podemos observar que a partir de 1986 a prevalência manteve-se inalterada, a despeito da eliminação de cães infectados (FNS, 1995). A incidência de casos humanos também tem se mantido estável nos últimos quatro anos no Estado do Ceará.(FNS, 1992).

No mesmo Estado, no município de São Luís do Curu, os cães têm sido examinado esporadicamente. Nos dois últimos anos, antes deste estudo, portanto, esta localidade apresentou uma média de 2% de prevalência (FNS, 1995) para o calazar canino (Tabela 3). Sua prevalência média para calazar humano tem sido de 5,03 por 100.000 habitantes entre 1980 e 1991, de acordo com dados do IBGE (IBGE, 1991) e da Secretaria Saúde do Estado do Ceará (Ceará, 1992) (Tabela 4, Figura 3).

Acreditamos que dentre outros fatores, dois que contribuem de forma significativa para a manutenção do coeficiente residual de infecção no cão, e conseqüentemente para a manutenção da prevalência da doença, são a baixa sensibilidade do teste de IFI e o tempo que o cão infectado permanece na área. Intervir no primeiro fator significa substituir o teste de IFI por um outro mais sensível. A única possibilidade de intervir no segundo fator é examinar os cães a intervalos mais curtos e diminuir o tempo decorrido entre a detecção laboratorial do cão infectado e sua eliminação. Atualmente, a duração média entre a data da coleta do sangue do cão no campo e a eliminação daqueles infectados tem sido 80 dias (FNS, 1995).

Evans et al. (1990) já haviam proposto o teste *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) como sendo mais sensível que a IFI, encontrando uma sensibilidade de 100% para o primeiro e de 83,3% para o segundo.

Em um outro estudo comparando a aplicação dos três métodos, realizado em Jacobina, Estado da Bahia, Ashford et al. (1993) reportaram uma sensibilidade de 75% para IFI, de 88% para o *Falcon assay screening test-ELISA* (FAST-ELISA) e de 90% para ELISA padrão, com uma especificidade de 93% para IFI, 90% para FAST-ELISA e 85% para ELISA padrão. Estes autores também demonstraram que a técnica de FAST-ELISA pode ser realizada num laboratório de campo, provendo os resultados imediatamente após a coleta do sangue. Neste trabalho, o laboratório ficou instalado num ponto fixo da cidade de Jacobina. Zalis et al. (1988) também utilizaram FAST-ELISA no campo com sucesso.

Tabela 3: Prevalência do Calazar Canino em São Luís do Curu, nos anos de 1990 e 1991, segundo dados do Programa de Controle da Leishmaniose no Estado do Ceará, da Fundação Nacional de Saúde.

ANO	CÃES EXAMINADOS	CÃES NEGATIVOS	CÃES POSITIVOS	PREVALÊNCIA (%)
1990	1173	1170	3	0,26
1991	1042	1003	39	3,74
Média	1107,5	1086,5	21	2,00

Fonte: Fundação Nacional de Saúde. Relatório Anual (1980 a 1995) do Programa de Controle da Leishmaniose, 1995.

Tabela 4: Coeficiente de incidência por 100.000 habitantes, do calazar humano em São Luís do Curu, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e do Sistema Único de Saúde, nos 12 últimos anos antes da pesquisa.

ANO	POPULAÇÃO	CASOS NOVOS DE CALAZAR	INCIDÊNCIA POR 100 MIL HABITANTES
1980	8.146	0	0
1981	8.153	0	0
1982	8.161	1	12
1983	8.169	2	24
1984	8.177	0	0
1985	8.185	1	12
1986	8.686	1	11
1987	9.187	0	0
1988	9.688	0	0
1989	10.189	0	0
1990	10.804	0	0
1991	10.609	0	0
Média	-	-	5

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Anuário Estatístico do Brasil, 1992. Sistema Único de Saúde. Boletim Epidemiológico, 1992.

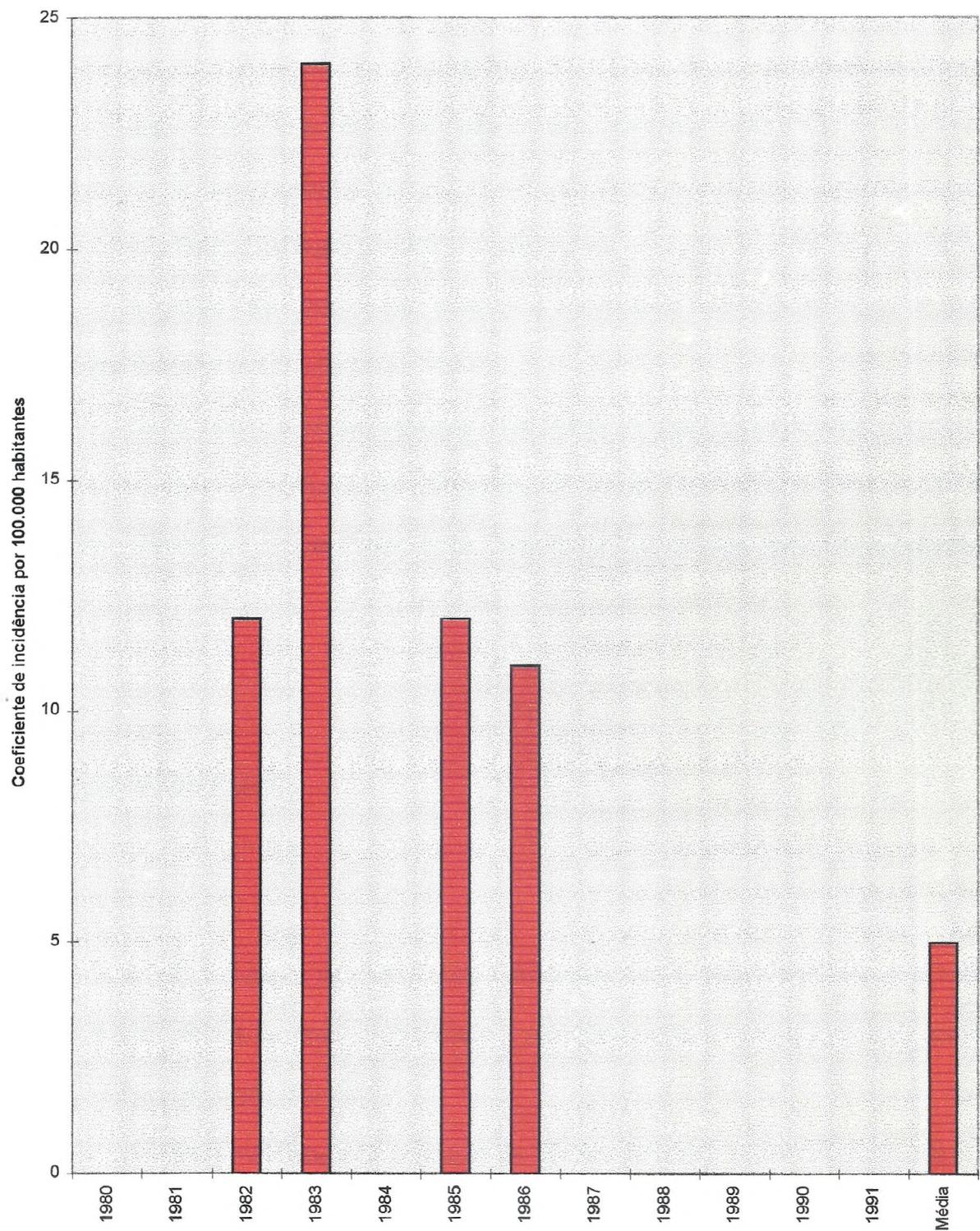
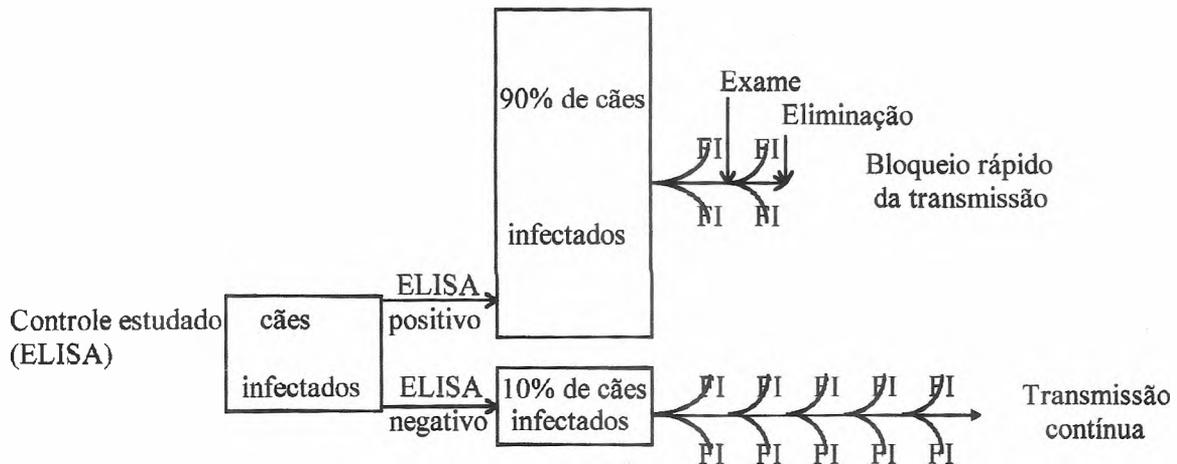
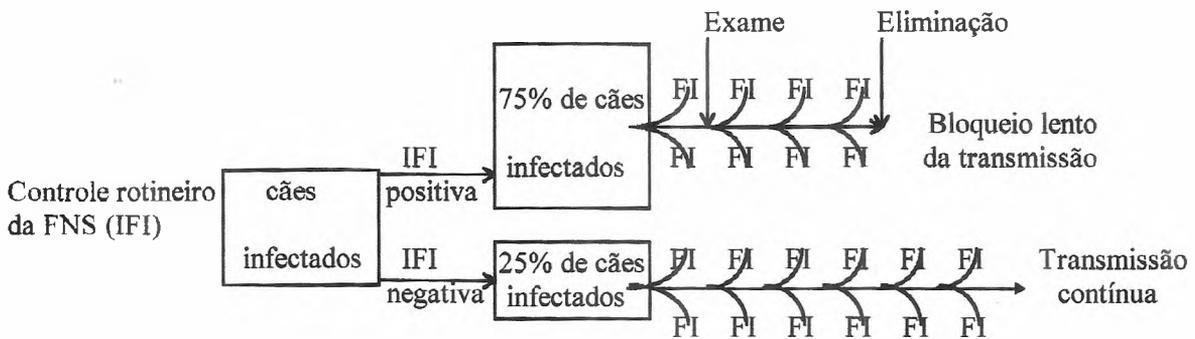
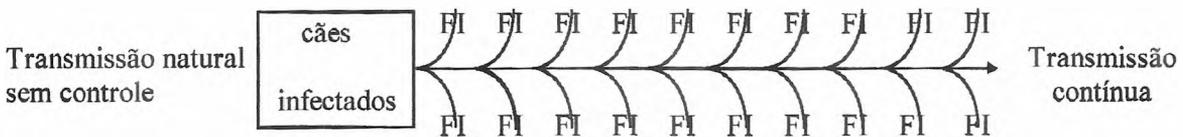


Figura 3: Coeficiente de incidência por 100.000 habitantes, do calazar humano em São Luís do Curu, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e do Serviço Único de Saúde, nos 12 últimos anos antes da pesquisa.

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Anuário Estatístico do Brasil, 1992. Sistema Único de Saúde. Boletim Epidemiológico, 1992

1.2 Modelo do Estudo

Modelo de transmissão do calazar entre cães na natureza e sobre a ação de controle pelas técnicas de exame IFI e ELISA, segundo a sensibilidade avaliada por Ashford e o tempo de permanência na comunidade após o exame.



FI= Flebótomo infectado.

2 METODOLOGIA

2.1 Definição dos Grupos

Medimos (inquérito inicial) primeiramente a prevalência basal de calazar nas duas populações de cães do município de São Luis do Curu, no Estado do Ceará, Brasil, através do ELISA padrão (Evans, 1990). Uma população foi submetida ao trabalho de rotina do Programa de Controle da Leishmaniose da FNS, o Grupo "A", com o tratamento "A" (controle rotineiro), onde o diagnóstico de positividade do cão era dado pela técnica da IFI e a eliminação era realizada no prazo de 80 dias. Foi o prazo médio transcorrido para todas as eliminações realizadas no ano de 1995, nos 7 municípios trabalhados em todo o Estado do Ceará (FNS, 1995). A outra população, que teve os animais a serem eliminados determinados pela positividade à técnica ELISA padrão e a eliminação realizada dentro de 7 dias após a coleta do sangue, foi denominada grupo "B", recebendo o tratamento "B" (controle proposto). Dez meses após a eliminação dos cães, medimos (inquérito final) novamente a prevalência em ambos os grupos pela mesma técnica do primeiro inquérito, o teste ELISA.

2.2 Área de estudo

O estudo esteve sediado em Fortaleza, no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Ceará, e foi desenvolvido numa área selecionada de aproximadamente 50 localidades dos municípios de São Gonçalo do Amarante e São Luís do Curu.

Ambos os municípios estão localizados na mesma microrregião geográfica do Estado, o Vale do Rio Curu, zona litorânea do Ceará, região nordeste do Brasil, e têm como economia básica a produção agrícola. Neles, a prevalência média do calazar canino era de 2% nos inquéritos realizados nos dois últimos anos através de IFI (FNS, 1995).

Cada localidade selecionada havia apresentado pelo menos um cão positivo para calazar no inquérito realizado no ano anterior ao início do estudo. A área não era endêmica para Doença de Chagas, evitando-se deste modo reações cruzadas (FNS, 1979).

No município de São Gonçalo do Amarante foi testada inicialmente a aplicabilidade da técnica FAST-ELISA. Em prédio residencial comum, fornecido pela prefeitura, foi instalado o laboratório, que era complementado por apoio instrumental do Centro de Saúde do Município, onde havia uma centrífuga para manuseio do sangue (separação do soro).

Em São Luís do Curu, 28 localidades foram ordenadas decrescentemente em termos de população canina. Por sorteio, a primeira foi alocada ao Grupo "B", a segundo ao Grupo "A" e sucessivamente foram distribuídas nos dois grupos de localidades (Tabela 5). Esperamos portanto, ao iniciarmos a pesquisa, contar com populações iniciais de tamanho aproximadamente igual (Tabela 6), com prevalências semelhantes, bem como com aproximadamente o mesmo universo de prédios visitados.

Todas as habitações localizadas na área definida foram visitadas; até mesmo aquelas em locais de difícil acesso. Não se realizou a pesquisa somente naquelas que se encontravam

fechadas ou onde havia permanente e completa recusa quando revisitadas. Foram registrados também os prédios comerciais.

2.3 Tamanho da amostra

Utilizamos uma população em torno de 500 cães residentes nos dois grupos de localidades. Para o cálculo do número de cães necessários em cada grupo, assumimos uma prevalência inicial pelo ELISA de 20% em ambos os grupos. No grupo tratado de acordo com a rotina esperamos um decréscimo na prevalência para 15%, e no grupo com eliminação imediata um decréscimo para 5%. Para ao final se obter uma diferença significativa ($p < 0,05$) deveríamos ter pelo menos 200 cães em cada grupo (Lwanga & Lemeshow, 1991). O município selecionado apresentava uma prevalência menor (2%), registrada em inquérito da FNS, mas anteriormente só havia sido trabalhado em localidades esparças. Somente não foram examinados os animais que não eram encontrados, mesmo quando o prédio era visitado pela segunda vez, e, aqueles menores de três meses de idade.

Nos cães menores de três meses, a exclusão pretendia seguir a rotina da FNS, na pesquisa do calazar canino, que busca evitar resultados falso-positivos a partir de anticorpos maternos, e também por serem extremamente baixos os índices de infecção canina nesta idade (Alencar, 1959).

Contávamos, deste modo, realizar cerca de 1.000 exames de cães ao final do período total da pesquisa, entre exames iniciais e repetições.

Tabela 5: Informações relacionadas às áreas dos dois grupos de localidades, colhidas no levantamento inicial.

DADOS	GRUPO "A" (ROTINA, FNS)	GRUPO "B" (TESTE)
Nº de Localidades	14	14
Nº de Domicílios	468	402
Nº de Cães Menores	21	23
Nº de Cães Ausentes	0	11
Nº de Cães Examinados	254	276

Tabela 6: Total de cães trabalhados, examinados pelas técnicas ELISA e IFI, no início e ao final dos 10 meses, nos dois grupos de localidades estudadas em São Luís do Curu.

GRUPO DE LOCALIDADES	NO INÍCIO	APÓS 10 MESES	TOTAL
Grupo "A" (Rotina, FNS)	254	239	493
Grupo "B" (Teste)	276	197	473
Total Geral	530	436	966

2.4 Técnicas de Laboratório

2.4.1 O antígeno

O antígeno foi preparado para os três métodos a partir de *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolada de um caso humano da região e cultivada em meio bifásico: McNeal, Novy & Nicolle (NNN) na fase sólida e Schneider com 20% de soro bovino fetal, 2% de urina humana, 200 UI/ml de penicilina e 200 µg/ml de streptomomicina (Evans, 1989).

Formas promastigotas eram expandidas em meio líquido de Schneider suplementado, como acima descrito, e, na fase estacionária, eram lavadas três vezes em salina tamponada com fosfato (pH 7,2). Após a lavagem, eram ajustadas para 5×10^9 parasitas por mililitro, distribuídas em alíquotas e conservadas até o uso em nitrogênio líquido.

Para a IFI, a suspensão de parasita na concentração de 5×10^9 foi diluída em 1:4 em salina tamponada com fosfato (pH 7,2). Cinco microlitros (5 µl) foram colocados em cada orifício da lâmina, secada em ar quente e envolta em papel manteiga e papel laminado. As lâminas eram conservadas a -20°C até o momento do uso (Mendonça et al., 1988).

Para o uso em FAST-ELISA e ELISA padrão, as formas promastigotas foram hidrolizadas com água destilada, congeladas e submetidas a sucessivos descongelamentos a 37°C e recongelamentos rápidos por nitrogênio líquido, por 10-12 vezes. A solução foi centrifugada a $4.000 \times g$ por 20 minutos (centrífuga Beckman GS6R) a 4°C, e o sobrenadante estocado em alíquotas, mantidas em nitrogênio líquido (Ashford et al., 1993; Evans et al., 1990).

2.4.2 Coleta de sangue

De cada cão foi retirada amostra sangüínea (5 ml) da veia tibial posterior, coletados através de punção. O sangue foi deixado coagular espontaneamente e separado o soro para o teste ELISA e FAST-ELISA. Uma gota do sangue foi colhida em papel filtro do tipo Klabin, para posterior preparação do eluato usado na IFI.

2.4.3 Ensaio com imunofluorescência indireta (IFI)

Oddo (1963) desenvolveu a técnica para o diagnóstico de *Leishmania (L.) donovani*, e Duxbury e Sadun no ano seguinte observaram a ocorrência de reações cruzadas com soros de pacientes infectados por outros parasitos (1964). Badaró et. al. compararam a reação com diferentes formas de apresentação da *Leishmania (L.) chagasi*, e, Mendonça et. al. (1988) estabeleceram as relações clínicas com a sorologia.

Dos cães a serem examinados, era colhida, através de punção venosa, uma gota de sangue em papel filtro do tipo Klabin. No laboratório, foi retirado, da mancha de sangue, um círculo de 1,5 cm de diâmetro, que era embebido em 250 µl de salina tamponada com fosfato (pH 7,2). Cinco microlitros (5 µl) desse eluato eram incubados com o antígeno de *Leishmania (L.) chagasi* em câmara úmida por 30 minutos, a 37°C.

Após três lavagens com salina tamponada com fosfato, foi adicionado o anticorpo anti-cão (IgG de coelho) conjugado à fluoresceína, comercialmente distribuído pela BIOLAB DIAGNÓSTICO S/A, diluído a 1/80 com 0,1% de tintura azul de Evans. Seguiu-se incubação

durante 30 minutos a 37°C e as lâminas foram então lavadas por três vezes em salina tamponada com fosfato.

Posteriormente, as lâminas foram secadas em ar quente e montadas em glicerina alcalina.

O passo seguinte foi a leitura, em microscópio ZEISS, do tipo de epi-iluminação em câmara escura, do laboratório da FNS. O resultado vinha da comparação visual com controle positivo e negativo (Mendonça et al., 1988).

2.4.4 Ensaio com ELISA padrão

Esta técnica foi aplicada segundo o proposto por Evans et al. (1990). Inicialmente foi desenvolvida para leishmaniose tegumentar por Anthony et. al. (1980). Em seguida MOHAMMED et. al. (1985) usaram promastigotas intactos de *Leishmania (L.) donovani* como antígenos. Posteriormente Badaró et. al. (1986) compararam a sensibilidade e a especificidade de antígenos extraídos de várias cepas de *Leishmania* para o diagnóstico do calazar, obtendo melhores respostas globais com os da *Leishmania (L.) chagasi*.

Placas de microtitulação foram sensibilizadas pelo antígeno por 12 horas a 4°C pela adição de 50 µl em cada poço, dissolvidos em tampão carbonato a 0,05 M, com pH 9,6.

Em seguida, eram bloqueados os sítios de ligação inespecífica com solução de salina tamponada com fosfato e soro bovino fetal a 1,5%, por 2 horas, à temperatura ambiente. As placas eram lavadas por três vezes em solução salina tamponada com fosfato a 0,15 M com soro bovino fetal a 1,5% (pH 7,2).

O soro a ser examinado foi diluído a 1/400 em salina tamponada com fosfato (PBS) e distribuído 50 µl por poço. Depois de incubadas com os soros diluídos por uma hora a 37°C, novamente as placas eram lavadas três vezes com salina tamponada com fosfato, contendo 0,05% de Tween 20.

Na seqüência, foi aplicado o segundo anticorpo, que compunha-se de IgG (de coelho) anti-cão conjugado à peroxidase, comercializado pela SIGMA CHEMICAL CO., na concentração ótima de 1/1000 em PBS/soro bovino fetal a 1,5%. As placas foram incubadas a 37°C por uma hora e lavadas como descrito acima.

Como substrato foi usado 2,2'azinobis (3-ethylbenzithiazoline sulfonic acid, ABTS) (SIGMA CHEMICAL CO.) em tampão de citrato-bicarbonato-peróxido de hidrogênio. As placas foram incubadas por 10 minutos, à temperatura ambiente.

A leitura era realizada em espectrofotômetro com filtro de 405nm (EMAX, MOLECULAR DEVICES). Controles positivos e negativos foram usados em cada ensaio. Os valores positivos foram aqueles maiores que dois desvios padrões acima da média dos controles negativos (Evans et al., 1990).

2.4.5 Ensaio com FAST-ELISA

A reação proposta por Ashford et al. (1993) difere essencialmente do ELISA pela possibilidade de leitura a olho nu e pelas placas usadas, que possuem protuberâncias esféricas que se encaixam nos poços das placas usadas inicialmente (ELISA).

O antígeno diluído em salina tamponada com fosfato (pH 7,2) foi incubado por 12 horas a 4°C na concentração de 10 µl/ml nas placas, onde as esferas ficavam imersas para serem sensibilizadas.

Ligações inespecíficas com os anticorpos foram evitadas através da incubação das esferas por quatro horas a 4°C em salina tamponada com fosfato, com 1% de albumina sérica bovina. Posteriormente, as esferas foram lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS) a 0,05% de Tween 20 por *spray*, a uma distância de 15 a 20 cm, por cerca de 20 segundos.

O soro canino foi diluído em salina tamponada com fosfato na proporção de 4 µl de soro para 96 µl de PBS. As esferas anteriormente sensibilizadas foram imersas no soro diluído, com leve agitação da placa por cinco minutos.

Após nova lavagem, como descrito anteriormente, as esferas foram mergulhadas em novas placas contendo proteína A conjugada à peroxidase, produzida pela SIGMA CHEMICAL CO., e diluída a 1:300. As placas foram agitadas por cinco minutos, à temperatura ambiente, após o que, foram novamente submetidas ao processo de lavagem já descrito.

Para a visualização dos resultados, foi usado como substrato o sistema TMB-Peróxido (KIRKEGAARD & PERRY, Paithersburg, MD). Cem microlitros (100 µl) da mistura de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio, na proporção de 50/50, foi pipetado em cada poço das placas. Após a incubação, as esferas eram retiradas quando o controle positivo mostrava uma alteração bem visível na coloração, enquanto que o negativo permanecia incolor. Isso geralmente acontecia em torno de cinco minutos. A reação era interrompida com a retirada das esferas (Ashford et al., 1993).

2.4.6 Isolamento dos parasitos

Foram isolados parasitos com a finalidade de se obter cães comprovadamente positivos, já que somente a pesquisa direta daria esta certeza. Serviriam para a aferição da sensibilidade das técnicas sorológicas usadas na pesquisa.

Para a cultura de *Leishmania*, foi coletado material de cães recolhidos em ambos os municípios (São Luís do Curu e São Gonçalo do Amarante). Todos foram selecionados dentre aqueles determinados positivos à pesquisa realizada pelo ELISA.

Após a morte por injeção intravenosa de solução hipertônica de cloreto de potássio, foi coletado material do baço, fígado, gânglios linfáticos e do próprio sangue. Esse material foi acondicionado assepticamente em tubos estéreis, contendo meio bifásico: meio sólido de McNeal, Novy & Nicolle (NNN) e como meio líquido a solução de Schneider com 20% de soro bovino fetal, 2% de urina humana, 200 UI/ml de penicilina e 200 µg/ml de streptomicina (Evans, 1989).

Os tubos de ensaio eram incubados em estufa a 26°C e a leitura realizada a cada sete dias, durante quatro semanas. Para a leitura, usou-se microscópio óptico com material em lâmina/lamínula.

2.4.7 Caracterização das cepas isoladas

A caracterização dos parasitos isolados foi feita, em primeiro lugar, através da reação de IFI utilizando anticorpos monoclonais espécie-específicos (Mendonça et al., 1988), desen-

volvidos em camundongos por Diane McMahon-Pratt e cedidos gentilmente ao Núcleo de Medicina Tropical da UFC.

Em segundo lugar, foi utilizada a eletroforese das enzimas. Seguiu-se o preconizado por Momen et al. (1985), limitando-se a quatro o número de enzimas estudadas, conforme adaptação de Vasconcelos et al. (1988). As enzimas e tampões usados haviam sido descritas anteriormente por Sales et al. (1986).

Para a análise por eletroforese em gel, os parasitas, cultivados da maneira anteriormente descrita (Evans, 1989), eram centrifugados a 1.500 x g por 10 minutos, a 4°C, lavados duas vezes com PBS (pH 7,3) contendo 0,15 M de NaCl e ressuspendidos em solução a 100mM de etilenodiamina tetracetato de sódio (EDTA) com salina (pH 8,0).

Usou-se um aparelho LKB 2117 Multiphor II ligado a uma fonte, um LKB 2197 Power supply, com o meio circulante a 5°C, mantido por circulador termostático LKB 2219 Multitemp II. O gel com 1% de agarose diluído em tampão eletródico 1:10 foi colocado em filme Gelbond para eletroforese, formando camadas de 1 mm e guardado em câmara úmida para uso no dia seguinte. As amostras foram aplicadas no gel com marcadores eletroforéticos: solução de tampão eletródico com 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol. O gradiente de voltagem foi de 20 V/cm e a migração terminava quando um dos marcadores atingia o ânodo. Foram usadas quatro enzimas (SIGMA CHEMICAL CO.), descritas a seguir com seus respectivos tampões eletródicos: malato desidrogenase (MDH), nucleoside hidrolase (NH1 & NH2) com o tampão 0,1 M Tris, 0,1 M de ácido maleico, 0,01 M de EDTA e 0,01 M de cloreto de magnésio (pH 7,4); 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) e glucose fosfato isomerase (GPI) com o tampão 0,2 M fosfato (pH 8,0), de acordo com o proposto por Momen et al. (1985). As bandas formadas permitiram a identificação das espécies *Leishmania (L.) chagasi* e *Leishmania (L.) brasiliensis*, identificadas pela OMS (1990) como MHOM/BR/74/PP/75 e MHOM/BR/75/M2903 respectivamente.

2.4.8 Especificidade

A especificidade das técnicas ELISA e IFI foi testada utilizando soros estocados no Núcleo de Medicina Tropical. Todos os testes foram realizados em um lote de 39 soros de cães negativos, provenientes de região livre da endemia (Curitiba, capital do Estado do Paraná, na região sul do Brasil).

3 RESULTADOS

3.1 Área de estudo

No município de São Luís do Curu, a pesquisa abrangeu dois grupos, cada um com 14 localidades. Foram visitados todos os prédios de ambos os grupos, mesmo aqueles de difícil acesso. Na totalidade das ações, foram trabalhados 2.068 prédios, entre residenciais, com e sem cães, e não-residenciais (Tabela 7). Na fase inicial, em 29% deles habitavam cães no grupo de localidades “A”, e na segunda fase, em 26,52% ainda existiam animais (Tabelas 8 e 9), reduzindo-se em 2,48% os prédios com cães domiciliados. Para o grupo de localidades “B”, no início, em 32,45% havia cães residentes, e ao final, em apenas 21,42% (Tabelas 10 e 11), uma redução de 11,03% nos cães residentes. No segundo levantamento, ao menor número de prédios com cães correspondeu o menor número de animais examinados em ambos os grupos de localidades (Tabelas 6, 8, 9, 10 e 11).

Tabela 7: Total de prédios trabalhados com cães examinados no município de São Luís do Curu, no início e no final do estudo, nos dois grupos de localidades pesquisados.

GRUPO DE LOCALIDADES	NO INÍCIO	APÓS 10 MESES	TOTAL
Grupo “A” (Rotina, FNS)	529	539	1068
Grupo “B” (Teste)	493	507	1000
Total Geral	1022	1046	2068

Tabela 8: Número de prédios visitados por localidade, com e sem cães, e percentuais totais, no levantamento inicial do grupo de localidades onde foi realizado o trabalho rotineiro da FNS em São Luís do Curu, com eliminação do cão realizada 80 dias após a coleta do sangue e diagnóstico pela IFI (Grupo “A”).

LOCALIDADES	PRÉDIOS				
	COM CÃES	SEM CÃES	NÃO RESIDENCIAIS	RECUSA OU FECHADOS	TOTAL
1- Melancia do Oliveira	10	8	4	7	29
2- Várzea Redonda	32	69	9	30	140
3- Bomfim	1	1	3	0	5
4- Melancia do Maturino	12	7	1	13	33
5- Umari	27	43	5	16	91
6- Varjota	6	9	3	5	23
7- Tapuio	13	19	4	4	40
8- São Lourenço	25	30	8	17	80
9- Frios	21	38	10	15	84
10- Timbaúba	12	10	6	5	33
11- Curral Velho	2	2	2	1	7
12- Buracão	3	3	0	1	7
13- Escócia	24	38	6	12	80
14- Lagoa do Estevão	2	1	0	0	3
Total	190	278	61	126	655
Percentual	29,01	42,44	9,31	19,24	100

Tabela 9: Número de prédios visitados por localidade, com e sem cães, e percentuais totais, no levantamento final do grupo de localidades onde foi realizado o trabalho rotineiro da FNS em São Luís do Curu, com eliminação do cão realizada 80 dias após a coleta do sangue e diagnóstico pela IFI (Grupo "A").

LOCALIDADES	PRÉDIOS				TOTAL
	COM CÃES	SEM CÃES	NÃO RESIDENCIAIS	RECUSA OU FECHADOS	
1- Melancia do Oliveira	10	10	3	6	29
2- Várzea Redonda	30	72	8	44	154
3- Bomfim	2	0	1	1	4
4- Melancia do Maturino	8	11	2	12	33
5- Umari	23	46	4	15	88
6- Varjota	4	16	0	2	22
7- Tapuio	13	21	5	2	41
8- São Lourenço	23	38	15	9	85
9- Frios	19	38	6	14	77
10- Timbaúba	15	10	7	5	37
11- Curral Velho	3	4	0	1	8
12- Buracão	3	0	0	3	6
13- Escócia	24	34	9	21	88
14- Lagoa do Estevão	2	0	0	1	3
Total	179	300	60	136	675
Percentual	26,52	44,44	8,89	20,15	100

Tabela 10: Número de prédios visitados por localidade, com e sem cães, e percentuais totais, no levantamento inicial das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho proposto, com eliminação do cão determinada pela positividade ao ELISA e realizada dentro de 7 dias após a coleta do sangue (Grupo “B”).

LOCALIDADES	PRÉDIOS				TOTAL
	COM CÃES	SEM CÃES	NÃO RESIDENCIAIS	RECUSA OU FECHADOS	
1- Melancia do Tabosa	24	26	12	17	79
2- Maniçoba do Valdivino	19	8	2	13	42
3- Tiririca	6	31	1	13	51
4- Lagoa Queimada	11	10	4	7	32
5- Cajazeiras	42	29	25	9	105
6- Cachoeira	9	11	3	6	29
7- Gameleira	3	5	1	2	11
8- Jurema dos Ribeiros	2	1	0	0	3
9- Maniçoba do Anibal	37	28	25	25	115
10- Boa Vista	25	24	14	7	70
11- Macacos	6	10	2	4	22
12- Monte	10	20	1	2	33
13- Estreito	2	0	1	2	5
14- Chapada do Espinho	0	3	0	4	7
Total	196	206	91	111	604
Percentual	32,45	34,10	15,07	18,38	100

Tabela 11: Número de prédios visitados por localidade, com e sem cães, e percentuais totais, no levantamento final das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho proposto, com eliminação do cão determinada pela positividade ao ELISA e realizada dentro de 7 dias após a coleta do sangue (Grupo “B”).

LOCALIDADES	PRÉDIOS				TOTAL
	COM CÃES	SEM CÃES	NÃO RESIDENCIAIS	RECUSA OU FECHADOS	
1- Melancia do Tabosa	15	33	8	21	77
2- Maniçoba do Valdivino	11	12	1	19	43
3- Tiririca	10	31	0	20	61
4- Lagoa Queimada	5	17	2	4	28
5- Cajazeiras	31	59	35	11	136
6- Cachoeira	10	17	2	8	37
7- Gameleira	1	1	0	1	3
8- Jurema dos Ribeiros	0	7	1	4	12
9- Maniçoba do Anibal	29	37	21	22	109
10- Boa Vista	15	32	11	12	70
11- Macacos	2	11	3	6	22
12- Monte	10	15	3	7	35
13- Estreito	0	2	4	6	12
14- Chapada do Espinho	0	3	0	1	4
Total	139	277	91	142	649
Percentual	21,42	42,68	14,02	21,88	100

3.2 Cães estudados

Foram examinados praticamente todos os cães das duas áreas, com exceção dos menores de três meses, idade em que é rara a incidência da doença. Corresponderam a 21 animais no grupo "A" e 23 no "B". Também evitamos assim, excluindo os menores de três meses, diagnósticos falso-positivos pela transferência de anticorpos maternos. Outra exceção foram os cães ausentes do domicílio por ocasião da visita, apesar de se voltar pelo menos mais uma vez a cada um deles. São pendências estimadas na rotina da FNS em 10% da população canina examinada, segundo comunicação pessoal de Lima (1995), da Fundação Nacional de Saúde. Em nossa experiência, somente no Grupo "A" existiram cães ausentes, em número de 11, referidos por seus donos como desaparecidos. No Grupo "B", todos os animais foram examinados (Tabela 5).

No grupo de localidades "A", foram examinados 254 cães no primeiro levantamento e 239 no segundo. No grupo de localidades "B", realizamos inicialmente 276 coletas e ao final 197. Durante os 10 meses que durou a pesquisa, foram coletadas 966 amostras de sangue canino (Tabela 6).

3.3 Prevalências

A prevalência em termos percentuais foi avaliada pelo teste ELISA nas duas áreas estudadas. No início foi de 36,61% para o Grupo "A" de localidades e de 45,65% para o Grupo "B" (Tabelas 12 e 13). Ao final do estudo, a prevalência foi reavaliada, havendo decrescido para 27,61% no Grupo "A" e para 19,28% no Grupo "B" (Tabelas 14 e 15), correspondendo a um decréscimo de 9% no primeiro grupo e de 26,37% no segundo (Tabela 16, Figura 4), ou seja, no

Grupo "B", a prevalência teve um decréscimo significativamente maior ($p= 0,0015$) (Fleiss, 1981) que no Grupo "A".

As duas áreas também foram avaliadas nos dois momentos pelo teste de IFI. A prevalência percentual na fase inicial foi de 12,99% no Grupo "A" e de 24,63% no Grupo "B". Reavaliada no fim da pesquisa, o percentual era de 8,78% no Grupo "A" e de apenas 3,55% no Grupo "B", mostrando assim uma redução de 32,41% para o primeiro grupo e de 85,59% para o segundo (Tabela 17, Figura 5).

No grupo de localidades definido como "A", eliminou-se todos os cães com resultados positivo à IFI no levantamento inicial, ou sejam, 33 cães (Tabela 12, Figura 5). No grupo de localidades "B", foram eliminados todos os animais positivos ao teste ELISA no primeiro levantamento realizado, num total 126 cães (Tabela 13).

No primeiro levantamento, os soros testados pelo ELISA que foram positivos corresponderam àqueles positivos pela IFI em 11% dos casos nas localidades do Grupo "A" (Tabela 18, Figura 6) e em 20% nas do Grupo "B" (Tabela 19, Figura 6).

Ao final da pesquisa, quando foi feita nova avaliação de prevalência, os positivos pelo teste ELISA somente corresponderam aos positivos pela IFI em 6% dos casos para as localidades do Grupo "A" (Tabela 20, Figura 6) e em 2% para as do Grupo "B" (Tabela 21, Figura 6).

Os exames negativos nas duas técnicas corresponderam sempre em níveis elevados. No levantamento inicial do grupo de localidades "A" a correspondência foi de 61%, enquanto que no final foi de 69% (Tabelas 18 e 20, Figura 7). Para o Grupo "B", foi de 49% no inicial e de 80% no final (Tabelas 19 e 21, Figura 7).

Globalmente os exames positivos ELISA e IFI foram concordantes em 10% dos casos. A concordância dos resultados negativos, também globalmente, foi de 64% dos 966 exames realizados (Tabela 22).

Tabela 12: Resultados comparativos dos exames realizados no sangue canino pelos dois testes, ELISA e IFI, no levantamento inicial das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho rotineiro da FNS, com eliminação do cão determinada pela positividade à IFI e realizada 80 dias após a coleta do material (Grupo "A").

LOCALIDADES	N° DE CÃES	TESTE			
		ELISA		IFI	
		+	-	+	-
1- Melancia do Oliveira	15	6	9	1	14
2- Várzea Redonda	39	18	21	3	36
3- Bomfim	1	0	1	0	1
4- Melancia do Maturin	14	3	11	1	13
5- Umarí	41	19	22	13	28
6- Varjota	8	2	6	0	8
7- Tapuio	20	11	9	3	17
8- São Lourenço	26	10	16	1	25
9- Frios	31	12	19	4	27
10- Timbaúba	16	2	14	0	16
11- Curral Velho	4	0	4	0	4
12- Buracão	5	2	3	1	4
13- Escócia	32	8	24	6	26
14- Lagoa do Estevão	2	0	2	0	2
Total	254	93	161	33	221
Percentual	100	36,61	63,39	12,99	87,01

Tabela 13: Resultados comparativos dos exames realizados no sangue canino pelos dois testes, ELISA e IFI, no levantamento inicial das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho proposto, com eliminação do cão determinada pela positividade ao ELISA e realizada dentro de 7 dias após a coleta do material (Grupo "B").

LOCALIDADES	Nº DE CÃES	T E S T E			
		ELISA		IFI	
		+	-	+	-
1- Melancia do Tabosa	34	19	15	5	29
2- Maniçoba do Valdivino	27	21	6	6	21
3- Tiririca	8	7	1	0	8
4- Lagoa Queimada	15	11	4	0	15
5- Cajazeiras	53	9	44	7	46
6- Cachoeira	17	3	14	2	15
7- Gameleira	3	2	1	0	3
8- Jurema dos Ribeiros	5	4	1	2	3
9- Maniçoba do Anibal	55	19	36	29	26
10- Boa Vista	37	19	18	14	23
11- Macacos	6	3	3	1	5
12- Monte	14	7	7	1	13
13- Estreito	2	2	0	1	1
14- Chapada do Espinho	0	0	0	0	0
Total	276	126	150	68	208
Percentual	100	45,65	54,35	24,63	75,37

Tabela 14: Resultados comparativos dos exames realizados no sangue canino pelos dois testes, ELISA e IFI, no levantamento final das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho rotineiro da FNS, com eliminação do cão determinada pela positividade à IFI e realizada 80 dias após a coleta do material (Grupo "A").

LOCALIDADES	N° DE CÃES	TESTE			
		ELISA		IFI	
		+	-	+	-
1- Melancia do Oliveira	12	5	7	1	11
2- Várzea Redonda	46	20	26	5	41
3- Bomfim	3	1	2	0	3
4- Melancia do Maturin	11	1	10	1	10
5- Umarí	31	0	31	3	28
6- Varjota	7	1	6	0	7
7- Tapuio	17	16	1	1	16
8- São Lourenço	24	1	23	0	24
9- Frios	23	8	15	0	23
10- Timbaúba	20	4	16	3	17
11- Curral Velho	5	1	4	1	4
12- Buracão	6	1	5	0	6
13- Escócia	31	6	25	6	25
14- Lagoa do Estevão	3	1	2	0	3
Total	239	66	173	21	218
Percentual	100	27,61	72,39	8,78	91,22

Tabela 15: Resultados comparativos dos exames realizados no sangue canino pelos dois testes, ELISA e IFI, no levantamento final das localidades de São Luís do Curu onde se produziu o trabalho proposto, com eliminação do cão determinada pela positividade ao ELISA e realizada dentro de 7 dias após a coleta do material (Grupo "B").

LOCALIDADES	Nº DE CÃES	TESTE			
		ELISA		IFI	
		+	-	+	-
1- Melancia do Tabosa	18	2	16	1	17
2- Maniçoba do Valdivino	14	3	11	0	14
3- Tiririca	11	4	7	0	11
4- Lagoa Queimada	5	0	5	0	5
5- Cajazeiras	42	12	30	2	40
6- Cachoeira	20	3	17	0	20
7- Gameleira	2	0	2	0	2
8- Jurema dos Ribeiros	0	0	0	0	0
9- Maniçoba do Anibal	50	12	38	1	49
10- Boa Vista	17	1	16	1	16
11- Macacos	2	0	2	0	2
12- Monte	16	1	15	2	14
13- Estreito	0	0	0	0	0
14- Chapada do Espinho	0	0	0	0	0
Total	197	38	159	7	190
Percentual	100	19,28	80,72	3,55	96,45

Tabela 16: Cães positivos examinados pelo ELISA, no início e no final da pesquisa, nos dois grupos de localidades estudados de São Luís do Curu, e decréscimo final da prevalência em cada grupo de localidades.

GRUPO DE LOCALIDADES	CÃES EXAMINADOS PELO ELISA						DECRÉSCIMO DA PREVALÊNCIA %
	NO INÍCIO			APÓS 10 MESES			
	TOTAL	+	%	TOTAL	+	%	
Grupo "A" (Rotina da FNS)	254	93	36,61	239	66	27,61	9,00
Grupo "B" (Proposto)	276	126	45,65	197	38	19,28	26,37

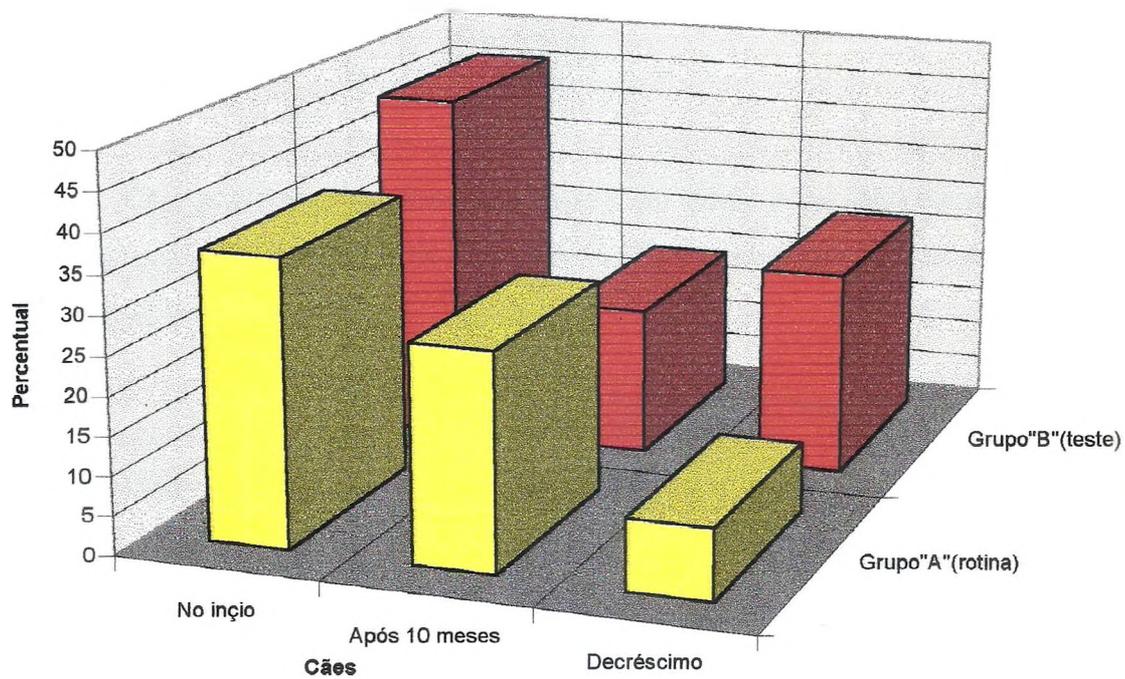


Figura 4: Percentuais de cães positivos avaliados pelo ELISA, iniciais e finais, nos dois grupos de localidades estudados de São Luís do Curu, e percentuais de redução final.

Tabela 17: Cães positivos examinados pela IFI, no início e no final da pesquisa, nos dois grupos de localidades estudadas de São Luís do Curu, e decréscimo final da prevalência em cada grupo de localidades.

GRUPO DE LOCALIDADES	CÃES EXAMINADOS PELA IFI						DECRÉSCIMO DA PREVALÊNCIA %
	NO INÍCIO			APÓS 10 MESES			
	TOTAL	+	%	TOTAL	+	%	
Grupo "A" (Rotina da FNS)	254	33	12,99	239	21	8,78	4,21
Grupo "B" (Proposto)	276	68	24,63	197	7	3,55	21,08

Tabela 18: Aproximação dos resultados no início da pesquisa. Percentual de coincidência entre ELISA e IFI nas localidades de São Luís do Curu trabalhadas segundo a rotina da FNS, com eliminação do cão 80 dias depois da coleta do sangue e diagnóstico de positividade fornecido pela IFI (Grupo “A”).

		ELISA (%)	
		+	-
IFI (%)	+	11	2
	-	26	61

Tabela 19: Aproximação dos resultados no início da pesquisa. Percentual de coincidência entre ELISA e IFI nas localidades de São Luís do Curu trabalhadas segundo o proposto, com eliminação do cão dentro de 7 dias depois da coleta do sangue e diagnóstico de positividade fornecido pelo ELISA (Grupo “B”).

		ELISA (%)	
		+	-
IFI (%)	+	20	5
	-	26	49

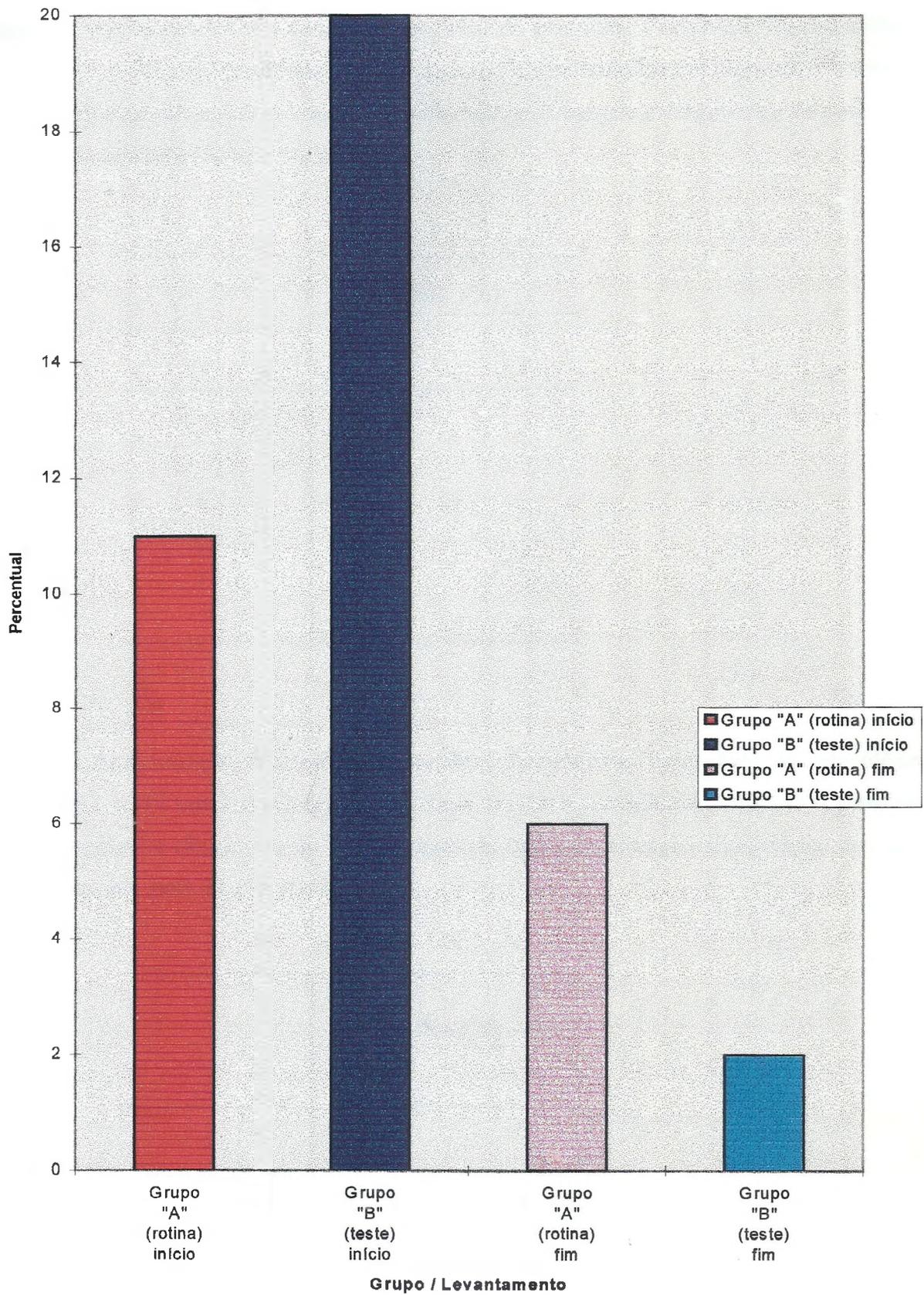


Figura 6: Concordância dos resultados positivos entre o teste ELISA e IFI no início e no final da pesquisa, nos dois grupos de localidades trabalhadas em São Luís do Curu.

Tabela 20: Aproximação dos resultados no final da pesquisa. Percentual de coincidência entre ELISA e IFI nas localidades de São Luís do Curu trabalhadas segundo a rotina da FNS, com eliminação do cão 80 dias depois da coleta do sangue e diagnóstico de positividade fornecido pela IFI (Grupo “A”).

		ELISA (%)	
		+	-
IFI (%)	+	6	3
	-	22	69

Tabela 21: Aproximação dos resultados no final da pesquisa. Percentual de coincidência entre ELISA e IFI nas localidades de São Luís do Curu trabalhadas segundo o proposto, com eliminação do cão dentro de 7 dias depois da coleta do sangue e diagnóstico de positividade fornecido pelo ELISA (Grupo “B”).

		ELISA (%)	
		+	-
IFI (%)	+	2	1
	-	17	80

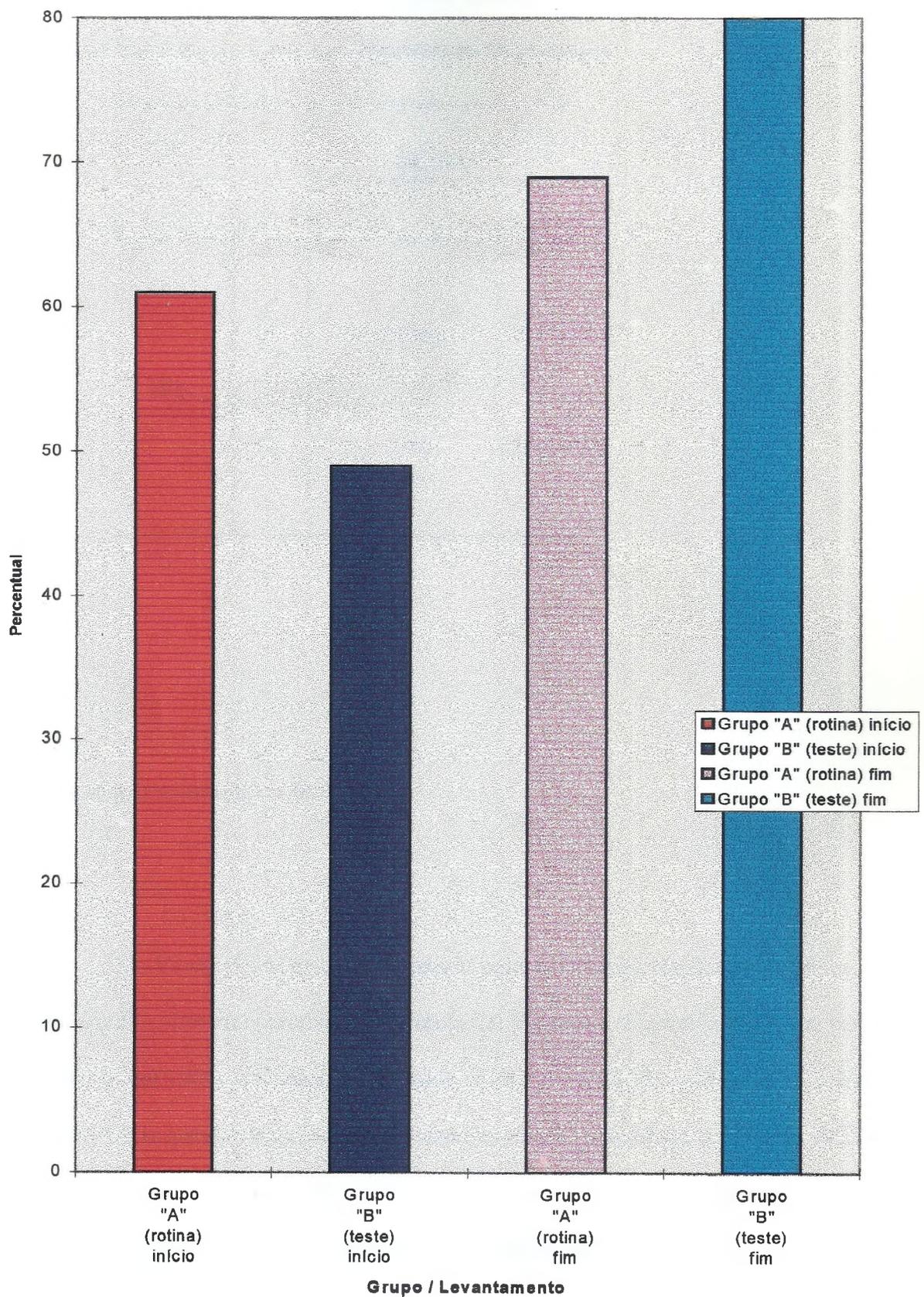


Figura 7 - Concordância dos resultados negativos entre o teste ELISA e IFI no início e no final da pesquisa, nos dois grupos de localidades trabalhadas em São Luís do Curu.

Tabela 22: Aproximação global dos resultados. Coincidência entre ELISA e IFI em todas as localidades de São Luís do Curu nos dois tempos da pesquisa.

		ELISA	
		+	-
IFI	+	101(10%)	28(3%)
	-	222(23%)	615(64%)

3.4 Exame parasitológico dos cães

Dos 82 cães com material biopsiado para cultura, 30 resultaram positivos, outros 30 negativos e 22 sofreram contaminação (Tabela 23, Figura 8). A concordância dos resultados positivos deu-se em 100% dos casos para o teste ELISA e em 43,33% para a IFI (Tabelas 24 e 25, Figura 9). Os resultados negativos destas culturas nunca coincidiram com os do ELISA, e o fizeram em 40% dos casos com a IFI (Tabelas 26 e 27). A cultura permitiu identificar, através da IFI e eletroforese em gel, *Leishmania (Leishmania) chagasi* em 29 casos e *Leishmania (Leishmania) brasiliensis* em um caso.

Tabela 23: Resultado das culturas para *Leishmania* realizadas em cães positivos ao teste ELISA de ambos os grupos de localidades pesquisadas em São Luís do Curu, a partir de biópsia do fígado, baço, sangue e gânglios linfáticos.

EXAMINADOS	RESULTADOS DA CULTURA		
	POSITIVOS	NEGATIVOS	CONTAMINADOS
82	30	22	30

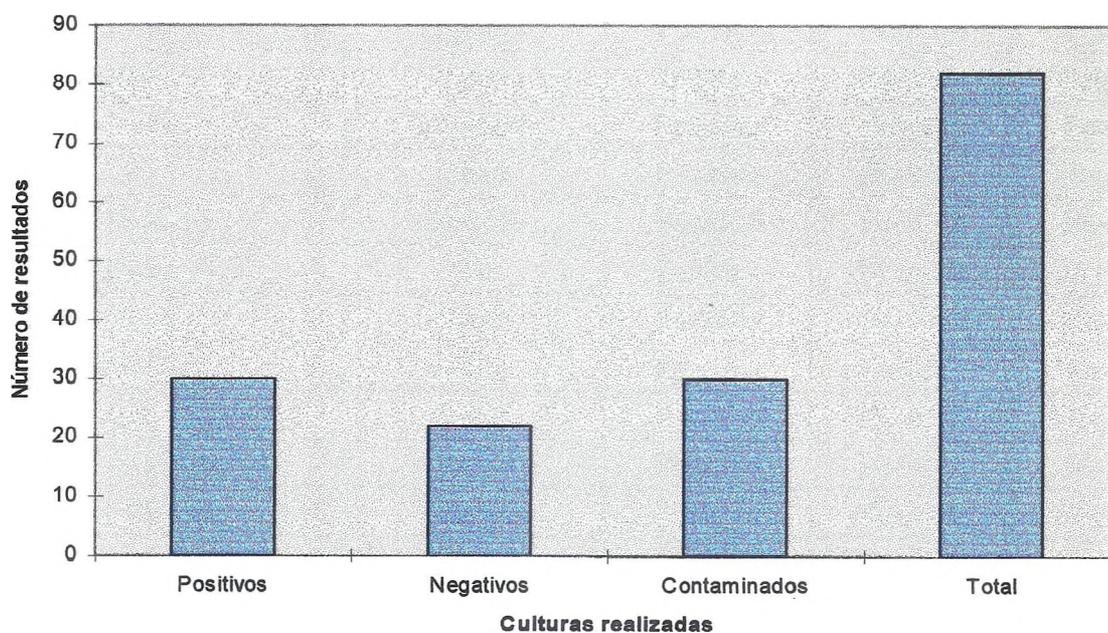


Figura 8: Resultado das culturas para *Leishmania* realizadas em cães positivos ao teste ELISA de ambos os grupos de localidades pesquisadas em São Luís do Curu, a partir de biópsia do fígado, baço, sangue e gânglios linfáticos.

Tabela 24: Resultado dos testes ELISA e IFI realizados em cães com cultura de fígado, baço, sangue ou gânglios linfáticos positivos em pelo menos uma das amostras, dos dois grupos de localidades pesquisados em São Luís do Curu.

N°	LOCALIDADES	NOME DO CÃO	RESULTADO		
			CULTURA	ELISA	IFI
01	Torrões	Brinco	Positivo	Positivo	Positivo
02	Ema	Paim	Positivo	Positivo	Negativo
03	Rio Novo	Leão	Positivo	Positivo	Positivo
04	Melancia do José	Leão	Positivo	Positivo	Negativo
05	Mudubim	Rainha	Positivo	Positivo	Negativo
06	Lagoa do Retiro	Baleia	Positivo	Positivo	Positivo
07	Lagoa dos Gomes	Raposa	Positivo	Positivo	Positivo
08	Ipiranga	Ferrim	Positivo	Positivo	Positivo
09	Caraúba do Herculano	Lesse	Positivo	Positivo	Positivo
10	Caraúba do Herculano	Rex	Positivo	Positivo	Positivo
11	Caraúba do Herculano	Japonês	Positivo	Positivo	Positivo
12	Queimadas	Lede	Positivo	Positivo	Negativo
13	Lagoa Nova	Lavrado	Positivo	Positivo	Positivo
14	Raposa	Chefe	Positivo	Positivo	Negativo
15	Canto Escuro	Tobato	Positivo	Positivo	Positivo
16	Canto Escuro	Rex	Positivo	Positivo	Positivo
17	Lagoa Nova	Lesse	Positivo	Positivo	Positivo
18	Cardeiros	Ralf	Positivo	Positivo	Negativo
19	Cardeiros	Jegue	Positivo	Positivo	Negativo
20	Lagoa do Maquiné	Baleia	Positivo	Positivo	Negativo
21	Campo Alegre	Princesa	Positivo	Positivo	Negativo
22	Campo Alegre	Leão	Positivo	Positivo	Negativo
23	Eixo do Carro	Preta	Positivo	Positivo	Negativo
24	Buique	Ralf	Positivo	Positivo	Negativo
25	Livramento do Viana	Leão	Positivo	Positivo	Negativo
26	Russinha	Piaba	Positivo	Positivo	Negativo
27	Melancias	Kelly	Positivo	Positivo	Negativo
28	Lagoa do Mato	Rainha	Positivo	Positivo	Negativo
29	Lagoa dos Altos	Pinguço	Positivo	Positivo	Negativo
30	Mundo Novo	Pelé	Positivo	Positivo	Negativo

Tabela 25: Resultados comparados dos testes ELISA e IFI com a cultura positiva para *Leishmania*, e respectivos percentuais de concordância.

TESTE	RESULTADOS			CONCORDÂNCIA DE POSITIVOS
	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL	
IFI	13	17	30	43,33%
ELISA	20	0	30	100,00%

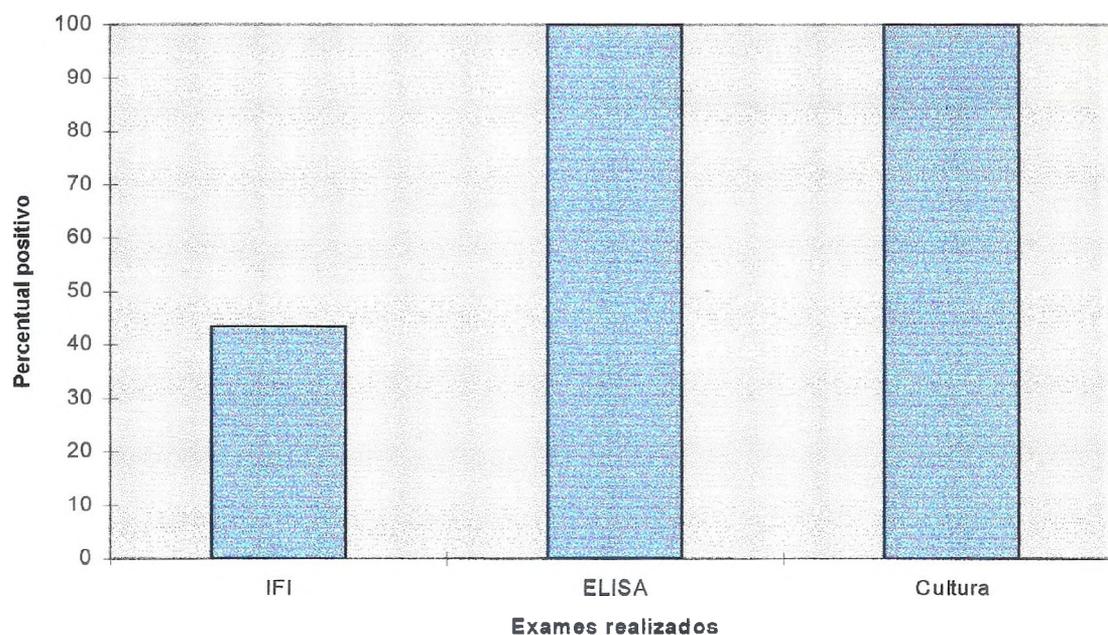


Figura 9: Percentuais de concordância dos testes ELISA e IFI positivos nos soros com resultado de cultura positiva de fígado, baço, sangue e gânglios linfáticos dos mesmos animais.

Tabela 26: Percentual de aproximação dos resultados. Exames coincidentes entre cultura positiva para *Leishmania* e teste ELISA .

		ELISA (%)	
		+	-
Cultura (%)	+	58	0
	-	42	0

Tabela 27: Percentual de aproximação dos resultados. Exames coincidentes entre cultura positiva para *Leishmania* e teste IFI .

		IFI (%)	
		+	-
Cultura (%)	+	25	33
	-	2	40

3.5 Especificidade

Soros caninos de área não-endêmica para leishmaniose visceral foram examinados pelas duas técnicas, ELISA e IFI, com todos os resultados negativando (Tabela 28). Não foram examinadas sorologicamente outras doenças veterinárias, porém foi encontrada *Dirofilaria sp.* em um dos cães necropsiados. No Ceará não existem áreas seguramente livres de calazar dentre as zonas endêmicas para doença de Chagas ou mesmo quaisquer doenças que acometam também o cão além do homem. Não foi possível portanto testarmos reações cruzadas com nenhuma delas com o teste ELISA, usando antígeno para *Leishmania (L.) chagasi*.

3.6 Utilização do FAST-ELISA

A reprodução da técnica FAST-ELISA somente foi conseguida em um primeiro momento no Núcleo de Medicina Tropical da UFC. No entanto, quando iniciamos a realização da técnica no campo, em São Gonçalo do Amarante, não houve reprodutibilidade dos resultados. Todos os soros examinados, inclusive controles negativos, deram positivos, não sendo possível determinar o *cutoff point*. Várias tentativas de ajuste da técnica foram realizadas, durante vários meses, ultrapassando os prazos do cronograma de trabalho. O teste foi então abandonado como proposta de trabalho e substituído pelo ELISA padrão.

Tabela 28 - Soros de cães de área não-endêmica, testados para as técnicas ELISA e IFI.

CÃES NEGATIVOS	TESTES	
	ELISA	IFI
Nº 01	Negativo	Negativo
Nº 02	Negativo	Negativo
Nº 03	Negativo	Negativo
Nº 04	Negativo	Negativo
Nº 05	Negativo	Negativo
Nº 06	Negativo	Negativo
Nº 07	Negativo	Negativo
Nº 08	Negativo	Negativo
Nº 09	Negativo	Negativo
Nº 10	Negativo	Negativo
Nº 11	Negativo	Negativo
Nº 12	Negativo	Negativo
Nº 13	Negativo	Negativo
Nº 14	Negativo	Negativo
Nº 15	Negativo	Negativo
Nº 16	Negativo	Negativo
Nº 17	Negativo	Negativo
Nº 18	Negativo	Negativo
Nº 19	Negativo	Negativo
Nº 20	Negativo	Negativo
Nº 21	Negativo	Negativo
Nº 22	Negativo	Negativo
Nº 23	Negativo	Negativo
Nº 24	Negativo	Negativo
Nº 25	Negativo	Negativo
Nº 26	Negativo	Negativo
Nº 27	Negativo	Negativo
Nº 28	Negativo	Negativo
Nº 29	Negativo	Negativo
Nº 30	Negativo	Negativo
Nº 31	Negativo	Negativo
Nº 32	Negativo	Negativo
Nº 33	Negativo	Negativo
Nº 34	Negativo	Negativo
Nº 35	Negativo	Negativo
Nº 36	Negativo	Negativo
Nº 37	Negativo	Negativo
Nº 38	Negativo	Negativo
Nº 39	Negativo	Negativo

4 DISCUSSÃO

4.1 Concordância entre IFI e ELISA

Atualmente, a FNS usa um teste sorológico (IFI) a partir do eluato do sangue previamente colhido em papel filtro, para diagnosticar cães com calazar (Brasil, 1994). Esta técnica tem uma sensibilidade muito pequena (75%), conforme registros na literatura por Ashford et al. (1993), levando-se em conta que estes usaram o soro e não o eluato. Evans et al. (1990) compararam a mesma técnica (IFI) realizada com o soro e com eluato. No primeiro caso, a IFI apresentou o dobro da probabilidade de detectar um cão infectado. Em nossa experiência usando o eluato, esta sensibilidade foi mais baixa que a determinada por Ashford et al. (1993) para o soro, e compatível com os resultados de Evans para o eluato. A IFI realizada em cães positivos à cultura também positivou em 43,33% (Tabela 25). Ressalvamos porém, que aqui este dado não expressa exatamente a sensibilidade, já que o material para a cultura foi todo retirado de animais selecionados somente pela positividade ao teste ELISA. Para o ELISA, Ashford et al. (1993) determinaram uma sensibilidade de 90%. Nossa seleção deixa de lado os 10% de cães infectados que a técnica não consegue determinar. Esta maneira de selecionar os animais para a cultura produziu uma amostra tendenciosa, no sentido de favorecer o aumento da prevalência determinada pelo ELISA. Ao mesmo tempo, possivelmente também altera a sensibilidade da IFI, já que exige animais necessariamente com anticorpos a níveis de detecção por um teste sorológico. Preferimos, portanto, desconsiderar este conceito como sensibilidade. De qualquer forma, esta taxa revela uma menor capacidade de detecção da infecção pela IFI em comparação com a técnica ELISA.

Evans et al. (1990) conduziram-se da mesma forma quando pretenderam avaliar comparativamente a sensibilidade dos dois métodos. Também os animais foram selecionados para a cultura a partir da positividade a um dos dois testes. A diferença é que também foi usada a IFI realizada a partir do soro, além do eluato. A tendência revelou uma sensibilidade para esse teste de 83,33% quando realizado com o soro e de cerca da metade quando usando o eluato, aproximando-se assim à nossa avaliação (43,33%). Com relação ao ELISA, a taxa encontrada foi a mesma que nós encontramos em nosso trabalho (100%). Com tal estratégia, são beneficiadas positivamente as avaliações de sensibilidade, pois não são incluídos aqueles casos de cães infectados que os métodos sorológicos não detectam.

Ashford et al. (1993), por outro lado, avaliaram mais precisamente a sensibilidade, quando aleatoriamente re-escolheram animais e os submeteram à biópsia, cultivando o material. Aos soros dos cães parasitados, aplicaram ELISA e IFI. Desta maneira, até mesmo aqueles animais cujo nível de anticorpos não atingiu o *cutoff point* dos testes sorológicos foram registrados no total de casos e incluídos como negativos. Daí, as menores taxas encontradas, em comparação com as de Evans et al. (1990), foram de 90% para o primeiro (ELISA) e de apenas 75% para o segundo (IFI).

Se compararmos o percentual de concordância entre os resultados da IFI e todos os casos examinados pela cultura para *Leishmania*, teremos para os positivos 25% e para os negativos 40% (Tabela 27).

O teste ELISA, usado opcionalmente por sua alta sensibilidade, registrada pelos autores acima, que referem 90%, quando avaliado por nós teve concordância de resultados positivos em 58% dos casos e de negativos em 42% (Tabela 26), referentes ao total de culturas realizadas. Apresentou, portanto, o dobro de coincidências nos resultados positivos, em relação à IFI. Se desprezarmos o vício da amostra e restringirmos o universo de comparação a apenas aquelas culturas que foram positivas, teremos 100% de acerto para o ELISA (Tabela 25).

Ambos os testes usados para a eliminação dos animais, quando tiveram seus resultados comparados, mostraram uma concordância maior no levantamento inicial quando era maior a quantidade de cães infectados na população. No levantamento final, provavelmente, também era menor a carga parasitária dos animais recém-infectados que não tiveram muito tempo para desenvolver grande parasitismo até o final dos dez meses, intervalo de tempo entre os dois levantamentos. No início, a coincidência de resultados positivos foi de 11% no grupo de localidades denominado "A" e de 20% no grupo de nominado "B" (Tabelas 18 e 19, Figura 6). Ao fim do estudo, caiu para 6% e 2%, respectivamente, nos dois grupos citados (Tabelas 20 e 21, Figura 6).

A concordância de resultados negativos foi mais expressiva em todas as fases do estudo. No levantamento inicial, foi de 61% no grupo de localidades "A" e de 49% no "B" (Tabelas 18 e 19, Figura 7). No levantamento final, foi de 69% e 80%, respectivamente (Tabelas 20 e 21). As especificidades dos testes foram comparadas através da aplicação de ambos, em soros importados de animais residentes em zona não-endêmica para a leishmaniose visceral. Todos os resultados foram negativos (Tabela 28). A especificidade, contudo, é de importância relativa para este estudo, já que cães falso-negativos eliminados não contribuiriam significativamente, em termos estatísticos, para reduzir a prevalência da doença.

4.2 Impacto nas prevalências

O índice de prevalência percentual sofreu alterações em ambos os grupos de localidades estudados. O levantamento realizado no início foi, em ambos os grupos, praticamente o dobro, quando comparamos os testes que foram aplicados. No Grupo "A", quando avaliada pela IFI, a prevalência foi de 12,99% (Tabela 17, Figura 5) e de 36,61% pelo ELISA (Tabela 16, Figu-

ra 4). No Grupo "B", a taxa foi de 24,63% pela IFI (Tabela 17, Figura 5) e de 45,65% pelo ELISA (Tabela 16, Figura 4), representando exatamente a maior sensibilidade deste último teste, detectando, portanto, um maior número de cães infectados. A comparação exclusivamente através do teste ELISA, nos dois tempos e para os dois grupos de localidades, mostrou uma consistente redução no Grupo "B", que foi de 26,37 pontos percentuais (Tabela 16, Figura 4). Para o Grupo "A", houve uma redução menor, atingindo, a nova taxa, uma redução de 9 pontos percentuais (Tabela 16, Figura 4). Esta variação no Grupo "B", onde os cães foram eliminados dentro de 7 dias após a coleta da amostra de sangue, sugere que a redução do tempo que um animal permanece infectante numa comunidade é um importante fator no controle do calazar. A agilidade do sistema de saúde em fazer o resultado dos testes regressar ao campo rapidamente, portanto, é um dos pontos principais a serem revisados no modelo atualmente desenvolvido pela FNS.

Observe-se ainda, que no Grupo "B" de localidades, onde a eliminação de cães infectados ocorreu dentro dos 7 dias após o exame, a medição da prevalência final foi depois de decorrido um prazo maior do que no grupo de localidades "A", onde a eliminação do cão deu-se 80 dias depois do exame. Mais especificamente no Grupo "B" de localidades, a prevalência final foi medida 39 semanas após a eliminação dos cães infectados, enquanto que no Grupo "A" a prevalência final foi medida 28 semanas após a eliminação dos animais infectados. Portanto, no Grupo "B", houve mais tempo para que a prevalência se recompusesse, sendo de se esperar, por conta deste fator isolado, uma prevalência maior do que a do Grupo "A". Esta observação depõe a favor da superioridade da estratégia usada no Grupo "B" para a redução do calazar entre cães.

Este estudo compara duas estratégias diferentes de trabalho, não se podendo avaliar qual dos dois fatores (a maior sensibilidade do exame ou a eliminação precoce do cão) tenha causado um maior impacto na redução da prevalência.

Enquanto a sensibilidade é uma qualidade intrínseca de um teste, a eliminação precoce depende da rapidez do diagnóstico, que por sua vez é consequência da disponibilidade de um método exequível no próprio local da pesquisa. Badaró et al. (1994) desenvolveram um teste

que carrega as duas características, utilizando uma fita contendo antígeno K39, extrato solúvel de *L. donovani* e reagentes imunoenzimáticos (Proteína A do *Staphylococcus aureus*), que ao entrar em contacto com o soro com os anticorpos anti-*Leishmania*, sofrem alteração na coloração. Trata-se de um novo horizonte que se vislumbra, prometendo novas perspectivas para o controle da doença.

4.3 Uso do FAST-ELISA

Finalmente, embora Zalis et al. (1988) e Ashford et al. (1993) houvessem proposto o uso em inquéritos epidemiológicos, tivemos dificuldades no estabelecimento da técnica FAST-ELISA para a aplicação no campo. Referidos autores usaram as condições ideais de um laboratório montado em zona urbana, ainda que próximo ao campo. Quando do desenvolvimento desta técnica no laboratório do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da UFC, conseguimos bons resultados. Entretanto, no município de São Gonçalo do Amarante, região onde foi testada sua aplicação imediatamente depois da coleta, em condições reais de campo, todos os resultados, inclusive os controles, foram sistematicamente positivos.

Observamos algumas dificuldades de ordem prática. A primeira foi relacionada à sensibilização das placas, e a seu transporte. Elas eram sensibilizadas no NMT, em Fortaleza, e duas vezes por semana os técnicos tinham que deixar o campo para, no laboratório, sensibilizá-las e bloqueá-las durante a noite, regressando no dia seguinte. A impossibilidade de prepará-las no próprio local da coleta fazia desaparecer a vantagem que o método aparentemente tinha sobre a IFI ou o ELISA, os quais precisavam de um apoio laboratorial relativo a equipamentos específicos. Transportar estas placas numa região extremamente quente, conservadas no gelo pela falta de energia elétrica no transporte, pode, por alterações de temperatura haver contribuído para a

desnaturação das proteínas. O manuseio, por parte de técnicos ainda pouco familiarizados, embora que treinados e supervisionados, aliado à relativa complexidade da técnica, possivelmente contribuíram para o erro. Depois de vários meses de tentativas infrutíferas, quando mesmo no NMT não se conseguia mais determinar o *cutoff point*, resolvemos substituí-lo, como hipótese de trabalho, pelo teste que determinaria as variações da prevalência, o ELISA. Para isso, agilizamos o envio dos resultados ao campo, já que a inexistência de um espectrofotômetro impedia que fosse realizado no próprio local da coleta. Rotineiramente, em uma viagem semanal, a equipe retornava à Fortaleza para receber os resultados destes testes, e, de volta ao campo, eliminava os animais positivos. O artifício funcionou a contento, e consideramos que, embora o segundo objetivo da pesquisa não tenha sido positivo, mantivemos ainda um teste sorológico que era consideravelmente mais sensível que a IFI, enquanto os cães positivos continuaram sendo eliminados dentro do curto prazo estabelecido.

5 CONCLUSÃO

A redução da prevalência do calazar canino na área testada, com os cães mortos imediatamente quando positivos ao teste ELISA, foi praticamente o dobro da área controle. Enquanto na primeira houve um decréscimo de 26,37%, no grupo controle a prevalência no início da pesquisa decresceu somente 9,00%.

O uso de duas estratégias de combate ao calazar canino, um exame mais preciso (ELISA) e a eliminação mais rápida do cão infectado, no presente trabalho, não tornou possível concluir qual, individualmente, foi mais eficaz. Entretanto foi evidente a vantagem do uso em conjunto.

Ambas as estratégias são de fácil introdução à rotina do FNS. Necessita-se porém de uma ampliação das pesquisas para o desenvolvimento de testes sorológicos que, além de mais sensíveis, tenham maior aplicabilidade nas condições de campo.

A técnica FAST-ELISA, no presente trabalho, não apresentou um resultado satisfatório, quando reproduzida em condições de campo.

ABSTRACT

The present work proposes others serologicals methods to substitute the present practice with indirect immunofluorescent assay (IFA), based in operational data from the fight against the visceral leishmaniasis by the *Fundação Nacional de Saúde* (FNS), agency of the Health Ministry of Brazil, in Ceará state. It analyses the applicability of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) tests as mass diagnostic methods for canine visceral leishmaniasis in the state. It proposes the fast elimination of the infected dogs, and starting with greater sensibility of these methods, suggest the elimination of the majority of contaminated dogs. It compares the routine work done by the FNS in endemic zones against the proposed, both were done in experimental scale, in two groups with the same number of localities, 14, in the same municipality, São Luis do Curu. From the beginning, and at the end of 10 months, follows the prevalence of the canine visceral leishmaniasis in the region, evaluating with the ELISA test. While in the localities where routine was realized it was observed that there was a decrease of 9.00% in prevalence, when the proposed work was done there was a reduction of 26.37%. In the first case the dogs was tested by the IFA method, and eliminated 80 days after collecting the blood for exam. In the second case the dog's elimination was carried within seven days after testing positive by the ELISA test. The author observed practical difficulties in the application of the FAST-ELISA technique, while in the field, and at the present situation in Ceará state.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALENCAR, J.E. **Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil.** Fortaleza: 1959. Tese de Livre Docência. UFC. Imprensa Oficial.
02. ALENCAR, J.E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 3, n. 4, p. 175-180, julho/agosto, 1961.
03. ALENCAR, J.E., ALMEIDA, Y.M., SILVA, Z.F., PAIVA, A.S., FONSECA, M.F. Aspectos atuais do calazar no Ceará. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 26-27, p. 27-53, 1975.
04. ALENCAR, J.E., CUNHA, R.V. Inquéritos sobre calazar canino no Ceará – Novos resultados. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 15, n. 3, p. 391-403, 1963.
05. ALENCAR, J.E., NEVES, J., DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In.: VERONESE, R. **Doenças infecciosas e parasitárias.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. c. 86, p. 706-17.
06. AMATO, V., NICODEMO, A.C. Leishmaniose visceral. In.: AMATO, V., BALDY, J.L.S. **Doenças Transmissíveis.** São Paulo: Sarvier, 1991. c. 46, p. 559-65.
07. ANTHONY, R. L., CHRISTENSEN, H., A., JOHSON, C. M. Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of new world leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 29, n. 2, p. 190-4, 1980.
08. ASHFORD, D.A., BADARÓ, R., EULÁLIO, C., FREIRE, M., MIRANDA, C., ZALIS, M.G., DAVID, J.R. Studies on the control of visceral leishmaniasis: Validation of the Falcon Assay Screening Test-Enzyme-Linked immunosorbent assay. (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, n. 1, p. 1-8, 1993.

09. BADARÓ, R., JONES, T.C., LOURENÇO, R., CERF, B.J., SAMPAIO, D., CARVALHO, E.M., ROCHA, H., TEIXEIRA, R., JOHNSON, W.D. A prospective study of visceral Leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Infect. Dis.** v. 154, n. 4, p. 639-49, out. 1986.
10. BADARÓ, R., NAKATANI, M., CHUN, P., REED, S. Novo teste rápido para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral. In.: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 30, 1994, Salvador. **Resumos.** Salvador: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1994. p. 248.
11. BADARÓ, R., REED, S. G., CARVALHO, E. M. Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 32, n.3, p. 480-84, 1983.
12. BADARÓ, R., REED, S, G., BARRAL, A., ORGE. G., JONES, T. C. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **Am. J. Med. Hyg.**, v.35, n. 1, p. 72-8, 1986.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (CALAZAR): Normas técnicas.** Brasília: 1994. 103p.
14. CEARÁ. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. **Casos de doenças notificadas por município no Estado do Ceará.** Bol. Epidemiol., v. 5, n. 7, p. 2, 1992.
15. CHRISTOPHER, S. R., - 1926-Reports of the Kala-azar Commission, India. Reports n. 1, (1924-25). Introduction. - **Indian M. Res. Mem.**, 4: 3-18.
16. CUNHA, R.V., ALENCAR, J.E., ANDRADE, F.B. Uso da reação de fixação de complemento para diagnóstico do calazar canino em inquérito de massa. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 15, p. 405-10, 1963.

17. DEANE, L.M. **Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará.** Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária. 1956.
18. DEANE, L.M., DEANE, M.P. Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani* no Ceará. **O Hospital.** v. 45, p. 703-7, 1954.
19. DEANE, L. M., DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital.** v. 47, p. 75-87, 1955.
20. DEANE, L.M., DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. **O Hospital.** n. 48, p. 61-76, 1955.
21. DEANE, L.M., DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 4, n. 3, p. 198-212, mai/jun, 1962.
22. DEANE, L.M., DEANE, M.P., ALENCAR, J.E. Observações sobre o combate ao *Phlebotomus longipalpis* pela dedetização domiciliária, em área endêmica de calazar, no Ceará. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 7, p. 131-41, 1955.
23. DEANE, M.P., DEANE, L.M. Infecção natural de *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em um foco de calazar no Ceará. **O Hospital**, v. 45, p. 697-701, 1954.
24. DUXBURY, R. E., SADUN, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med.** v.13, p 525-9, 1964
25. EVANS, D. Methods for the isolation and cryopreservation of *Leishmania*. In: UNDP/WORLD BANK/WHO - **Special Program for Research and Training in Tropical Diseases.** Geneva: 1989, p. 139-50.
26. EVANS, T.G., VASCONCELOS, I.A.B., LIMA, J.W., TEIXEIRA, J.M., McAULLIFE, I.T., LOPES, U.G., PEARSON, R.D., VASCONCELOS, A.W. Canine visceral leishmani-

- asis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnosis methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 42, p. 118-23, 1990.
27. FLEISS, J.L., **Statistical methods for rates and proportions**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1981. c. 7, p. 100-111.
28. FNS. Fundação Nacional de Saúde. Coordenadoria Regional no Ceará. **Inquérito sorológico para a avaliação da doença de Chagas no Ceará, 1976-1979**. Informal. Fortaleza: 1979.
29. _____. **Leishmaniose. Informe epidemiológico do S.U.S.** n.i, p.30-3, 1992.
30. _____. **Relatório Anual (1980 a 1995) do Programa de Controle da Leishmaniose**. Informal. Fortaleza: 1995.
31. GRADONI, L., POZIO, E., GRAMICCIA, M., MAROLI, M., BETTINI, S. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 77, n. 4, p. 427-31. 1983.
32. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário Estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro: 1992, 207p.
33. _____. **Censo demográfico**. Ceará. Rio de Janeiro: 1991: 60p.
34. LIMA, J.W.O. **Calazar, controle de reservatório**. Entrevista.
35. LWANGA, S.K., LEMESHOW, S. **Two-sample situations in sample size determination in health studies**. World Health Organization, Geneva: 1991.
36. MENDONÇA, S.C.F., SOUZA, W.J.S., NUNES, M.P., MARZOCHI, M.C.A., COUTINHO, S.G. Indirect immunofluorescence test in new world Leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 89, n. 3, p. 347-55, 1988.
37. MOHAMMED, El A. El R., WRIGHT, E. P., KAGER, P.A., LAARMAN J.J., PONDMAN, K.W. ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, p. 344-50, 1985.

38. MOLYNEUX, D. H., RYAN, L., LAINSON, R., SHAW, J. J. **The *Leishmania*-sandfly interface.** Montpellier, 1986. p. 311-24 (IMEEE).
39. MOMEN, H., GRIMALDI, J.R.G., PACHECO, R.S., JAFFE, C.L., McMAHON-PRATT, D. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania* mayor. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, p. 1076-84, 1985.
40. OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Lucha contra las leishmaniasis.** Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de informes técnicos 793. Ginebra: 1990. p. 27-9.
41. ODDO, F. G., CASCIO, G. Il test di immuno-fluorescenza nelle leishmaniosi viscerale e cutanea. **Riv. Ist. Sieroter. Italiano**, v.38, p 105-48, 1963.
42. PEARSON, R.D., SOUSA, A.Q. *Leishmania* species: visceral (Kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In.: MANDELL, G.L., BENNETT, J.E., DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases.** New York: Churchill Livingstone, 1995. c. 254, p. 2428-42.
43. RIBEIRO, J.M.C., VACHEREAU, A., MODI, G.B., TESH, R.B. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Science**. v. 243. p. 212-4, jan, 1989.
4. RIDLEY, D.S., Pathology. In: PETERS, W., KENDRIX, R.K. **The leishmaniasis in biology and medicine.** London : Academic Press, 1987. v. 2, cap. 14, p. 665-702.
5. ROUQUEIROL, M, Z. **Epidemiologia & Saúde.** 4 ed. Rio de Janeiro: MEDISI, 1993. p 41.
5. SALLES, C. A., SILVA, A. R., MONEN, H. Enzyme typing and phenetic relationships in *Vibrio cholerae*. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 9, n. 3, p. 407-19, 1986.
7. SACKS, D. L., PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, p. 1417-19, 1984.

48. SACKS, D. L., PERKINS, P. V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 3, p.456-9, 1985
49. SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol. today**. v. 9, n. 7, p. 233-35, 1993.
50. SHERLOCK, I.A., GUITTON, N. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. III. Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.** v. 21, n. 3, p. 541-8, 1969.
51. SHERLOCK, I.A., MIRANDA, J.C., SADIGURSKY, M., GRIMALDI, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 511, out/dez, 1984.
52. TESH, R.B. Control of zoonotic visceral Leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 3, p. 287-92. 1995.
53. TITUS, R.G., RIBEIRO, J.M.C. Salivary gland lysates from the Sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**. v. 239, p. 1306-8, mar, 1988.
54. TRAVI, B.L., JARAMILLO, C., MONTOYA, J., SEGURA, I., ZEA, A., GONÇALVES, A., VELLEZ, I.D. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 5, p. 557-65. 1994.
55. VASCONCELOS, I. A.B., VASCONCELOS, A. W., MONEN, H., GRIMALDI, JR., ALENCAR, J. E. Epidemiological studies on American leishmaniasis in Ceará State, Brazil. **Am. Trop. Med. Parasitol.**, v.82, n. 6, p.547-54, 1988.
56. ZALIS, M.G., BARCINSKI, M.A., VASCONCELOS, A.W., LIMA, J.O., DAVID, J.R. On site serodiagnosis of visceral leishmaniasis in dogs using a F.A.S.T. ELISA method for epidemiological studies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, (Sup. 1), p. 130, 1988.