

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

Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997

Waneska Alexandre Alves ¹
Paula Dias Bevilacqua ²

Abstract

In Brazil, visceral leishmaniasis poses a serious endemic and epidemic problem. In recent years the disease has spread to several States that had not previously reported any human or animal cases. For canine surveys, the Ministry of Health currently recommends use of the indirect immunofluorescence assay (IIF), with a sensitivity of 90-100% and specificity of 80%. Use of IIF may decrease the effectiveness of the Kala Azar Control Program by not detecting, and thus failing to sacrifice, false-negative infected animals. On the other hand, the program incorrectly identifies and leads to the unwarranted sacrifice of false-positive uninfected animals. Such uncertainties have already led to disagreement over the Program's objectives, such as the recommendation by some veterinarians that infected animals be treated. This work analyzes the quality of diagnosis of canine epidemic surveys against the backdrop of a visceral leishmaniasis epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais State, from 1993 to 1997.

Visceral Leishmaniasis; Diagnosis; Dogs

Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave, atingindo crianças, adultos jovens ou pessoas imunodeprimidas e, quando não tratada, pode apresentar letalidade de 95%. Em cães, seu principal reservatório doméstico, há uma prevalência significativa, sendo que muitos casos são assintomáticos ou oligossintomáticos ^{1,2,3}.

Os diagnósticos humano e canino precoces se fazem necessários por se tratar de uma doença que pode ser fatal para o ser humano, e por ser necessária a adoção de medidas de controle específicas sobre o reservatório doméstico da doença, incluindo seu sacrifício quando este se encontra infectado.

Leishmaniose visceral: zoonose de caráter reemergente e emergente

Inicialmente, a LV foi descrita como uma doença esporádica, do ambiente silvestre ou rural, atingindo indiferentemente seres humanos ou cães que vivessem em contato íntimo com a mata ⁴; posteriormente foi caracterizada como de ocorrência endêmica, com surtos epidêmicos esporádicos, em zonas de "boqueirão" de áreas rurais do Nordeste brasileiro ⁵.

A LV, na atualidade, tem sido apontada como doença reemergente, caracterizando nítido processo de transição epidemiológica, apre-

¹ Programa de Treinamento em Epidemiologia Aplicada aos Serviços do SUS, Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.

² Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

Correspondência

Paula Dias Bevilacqua
Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa,
Av. P. H. Rolfs s/n,
Campus UFV, Viçosa, MG
36570-000, Brasil.
paula@mail.ufv.br

sentando incidência crescente nos últimos anos nas áreas onde ocorria tradicionalmente; expansão geográfica para os estados mais ao sul do país e também um franco processo de urbanização em cidades localizadas em regiões distintas, como o Nordeste e o Sudeste. Cidades como: Boa Vista e Santarém (Região Norte); Teresina, São Luiz, Natal e Aracaju (Região Nordeste); Montes Claros, Belo Horizonte, Araçuaí, Sabará, Perdões e Rio de Janeiro (Região Sudeste) e Cuiabá (Região Centro-Oeste) já vivenciaram ou vivenciam, recentemente, epidemias de LV humana e canina ^{6,7,8,9,10,11}.

Crescem também, o número de casos de infecção concomitante por HIV (vírus da imunodeficiência humana) e *Leishmania*, fazendo com que a co-infecção entre HIV-*Leishmania* seja considerada como doença infecciosa emergente. A manifestação clínica mais freqüente na co-infecção é a LV, apesar de que várias formas cutâneas da doença também já foram descritas. Este quadro é bastante significativo nos países do sul europeu, onde mais de 70% dos casos de LV em adultos estão relacionados com HIV/AIDS e 9% de todos os pacientes com AIDS sofrem de LV recém-adquirida ou que foi reativada de uma infecção antiga ¹².

A sobreposição das áreas geográficas de ocorrência de leishmanioses e HIV/AIDS tem sido recentemente acentuada pelo processo de urbanização vivenciado pela primeira e pela ruralização da segunda. O significado epidemiológico desta expansão simultânea, demonstrado por vários estudos, reside no fato de que os pacientes com HIV/AIDS, que vivem em áreas endêmicas de leishmanioses, apresentam maior risco de manifestá-las e que a co-infecção entre HIV-*Leishmania* acelera o curso clínico da infecção por HIV ^{12,13}. Dessa forma, as leishmanioses têm ganhado importância como infecção oportunística entre pacientes com infecção por HIV que vivem ou viveram em áreas consideradas endêmicas para essas parasitoses.

O diagnóstico e sua história

Até a década de 30, o diagnóstico humano e os inquéritos caninos eram realizados por meio dos exames diretos como a punção de fígado, de baço e o raspado de pele. Esses exames são seguros quanto à positividade dos casos, mas não eficazes para realizar uma cobertura total dos animais positivos ¹⁴.

O exame sorológico, realizado pela reação de fixação do complemento (RFC), foi utilizado pela primeira vez, para diagnosticar a LV humana, em 1938. Em 1957, pesquisadores brasi-

leiros descreveram a RFC para inquéritos caninos, com antígeno extraído do bacilo da tuberculose, concluindo que, esta técnica possuía sensibilidade e especificidade melhores que os exames diretos. Com a demonstração da possibilidade de aplicação da RFC em eluatos de sangue colhidos em papel de filtro, essa técnica tornou-se largamente difundida ¹⁵, com a vantagem sobre os demais métodos sorológicos de não apresentar reações cruzadas com outras enfermidades, mesmo quando se utilizam antígenos heterólogos ^{16,17,18,19,20}.

Contudo, reações cruzadas em títulos baixos com a doença de Chagas e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) podem ocorrer. Nos casos de LV, comumente são observados títulos elevados de anticorpos no soro, geralmente superiores a 1:80, sendo que títulos inferiores a esse necessitam de confirmação por outras metodologias ³.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizada a partir da década de 60 ³, demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro ^{21,22}. A especificidade desse teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, como o da doença de Chagas e os da LTA ^{21,23}. A utilização de formas amastigotas de *L. (L.) donovani* como antígeno nas RIFI aumenta significativamente a sensibilidade, sem perder a especificidade do teste, resultando numa maior precocidade do diagnóstico frente a animais assintomáticos ou oligossintomáticos ²⁴.

A necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 70, muitos estudos avaliando e aprimorando o ELISA-padrão, assim como, as diversas variações de ELISA: Dot-ELISA, fucose manose ligant-ELISA ou FML-ELISA, bovine submaxillary mucin-ELISA ou BSM-ELISA, Fast-ELISA, micro ELISA, entre outras ^{17,18,25,26,27,28,29,30}. A utilização de antígenos recombinantes ou purificados como as glicoproteínas de membranas gp63, gp72, gp70 e rK39 específicas do gênero *Leishmania*, melhoram a sensibilidade e a especificidade da técnica. Entretanto, reações cruzadas com enfermidades causadas por outros tripanossomatídeos podem ainda ocorrer ^{21,31,32,33}.

O teste de aglutinação em gota (DAT), citado como um método alternativo para o diagnóstico da LV, foi descrito pela primeira vez em 1975 e adaptado para o diagnóstico da infecção humana e canina no final da década de 80 ³⁴. Em trabalhos comparativos entre ELISA, RIFI e DAT, este último demonstrou ser igualmente

sensível e específico como o ELISA^{22,35}. A grande vantagem desse teste está na sua simplicidade e de baixo custo, quando comparado aos outros

A performance dos testes diagnósticos utilizados atualmente é, em muito, limitada pelo antígeno utilizado na técnica. De uma forma geral, são utilizados parasitos totais ou lisados, o que interfere na expressão da especificidade do teste, não alcançando este o valor de 100%³⁶. A identificação de antígenos dominantes, que se caracterizam por induzir a formação de anticorpos específicos detectáveis nos testes sorológicos, tem contribuído para melhorar os testes diagnósticos. O mais potente e promissor antígeno sorológico, o rk39 clonado de *L. chagasi*, possui epítopos de alta densidade. A proteína A conjugada com ouro coloidal, como sistema de detecção deste antígeno, permite uma ligação com o anticorpo específico em segundos e a totalidade do teste pode ser completada entre 1-10 minutos. Este método, o TRALd, vem sendo testado no Brasil³⁶.

Recentemente, desenvolveu-se a técnica de PCR (reação em cadeia polimerase), que é a mais específica e sensível. Com essa técnica é possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do cineplasto do parasita. Infelizmente, suas limitações para uso em inquéritos epidemiológicos se baseiam no custo, disponibilidade de reagentes, equipamentos e pouca adaptabilidade do método ao campo³⁶.

Apesar da grande variedade de testes já desenvolvidos, seja no passado, seja mais recentemente, a RIFI ainda é o teste de eleição para ser utilizado em inquéritos epidemiológicos por reunir uma série de vantagens como: ser de fácil execução, rápido, barato, apresenta adequadas sensibilidade e especificidade, quando comparado com outras técnicas.

Aspectos relacionados ao controle da leishmaniose visceral

As campanhas de controle para a LV no Brasil tiveram seu início na década dos anos 50, sendo os Estados do Ceará e de Minas Gerais os principais alvos das atividades planejadas e desenvolvidas. Entretanto, durante a década de 60, as ações foram interrompidas e apenas em 1982, o programa foi retomado, quando a extinta Superintendência de Controle de Endemias (SUCAM) detectou um aumento do número de casos de LV no Brasil^{11,37}.

Atualmente, o Ministério da Saúde (MS), por intermédio da FUNASA (Fundação Nacional de Saúde) e de Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, realiza o Programa de Con-

trole da LV centrado nas seguintes medidas: diminuir a densidade populacional do vetor, identificação e eliminação dos cães infectados e identificação e tratamento das pessoas doentes^{10,38}.

O teste diagnóstico recomendado pelo MS para ser utilizado nos inquéritos caninos é a RIFI. Apesar das reconhecidas vantagens apresentadas por esta técnica, como facilidade na execução, rapidez na emissão de resultados e baixo custo, alguns problemas existem com relação à sua precisão, expressos numa sensibilidade que varia de 90-100% e numa especificidade de 80% para amostras de soro^{21,22,38}.

A epidemia de LV humana e canina vivenciada em Belo Horizonte, Minas Gerais, representa uma situação interessante a ser exemplificada, por ter suscitado uma série de debates, por parte dos clínicos veterinários de pequenos animais, com relação à validade do teste diagnóstico RIFI, utilizado pela Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte (SMS-BH).

Segundo esses profissionais, o teste estaria identificando grande número de animais falsos positivos e, sendo assim, não seria o mais específico para o diagnóstico da LV, pois poderia apresentar reação cruzada com outras enfermidades, como a LTA ou a doença de Chagas. Essas incertezas geraram atitudes como a não indicação do sacrifício de animais positivos, a orientação para que os proprietários retirassem os cães positivos do município e inclusive, a recomendação de tratamento desses animais³⁹.

Durante o período de 1993 a 1997, foram realizadas pesquisas sorológicas para detecção de animais positivos, como parte das ações do programa de controle desenvolvido pela prefeitura. Nesse período, de um total de 415.683 cães examinados, 15.117 foram identificados como positivos. Considerando a prevalência verificada no período acima (3,64%), os valores preditivos positivo e negativo da RIFI são, respectivamente, 14,5% e 99,5%, calculados conforme Soares & Siqueira⁴⁰. Verificamos que dos 400.566 animais diagnosticados como negativos, 2.003 seriam, na verdade, falsos negativos e dentre os 15.117 positivos, 12.925 seriam falsos positivos. De fato, corroborando as suspeitas levantadas pelos clínicos veterinários de pequenos animais.

Os valores preditivos são indicadores utilizados para a interpretação de um resultado de um teste diagnóstico, sendo influenciados pelas respectivas sensibilidade e especificidades do teste, além da prevalência da doença na área em questão. Percebe-se que, na situação da epidemia de LV canina em Belo Horizonte, o valor preditivo negativo alcança um valor ele-

vado (99,5%), tanto pelo fato da sensibilidade da RIFI ser alta (90-100%) como pelo fato da prevalência da doença canina ser baixa (3,64%). O oposto é verificado para o valor preditivo positivo, cujo valor de 14,5% pode ser explicado pela menor especificidade da RIFI (80%) e também pelo fato da prevalência da LV canina ser baixa em Belo Horizonte.

Nesse contexto, podemos afirmar que existe uma elevada confiança no resultado negativo de um animal, não sendo verdade tal assertiva para um cão que apresente exame com resultado positivo para LV pela RIFI. Como implicações práticas nas atividades de controle da LV canina na capital mineira, o programa sacrificou 12.924 animais falsos positivos e deixou de sacrificar 2.003 animais falsos negativos.

Os números acima chamam a atenção pela diferença, entretanto, não podemos deixar de examiná-los à luz do fato de que a LV é uma zoonose e, associada à epidemia canina, a Cidade de Belo Horizonte também vivenciou uma epidemia humana, com 169 casos diagnosticados no período de 1994 a 1997 e 17 óbitos, sendo que ambos os eventos ainda acometem o município^{10,39,41}.

A questão que se coloca frente à situação de sacrifício de animais falsos positivos é a necessidade de aprimoramento das técnicas diagnósticas, principalmente no que concerne à especificidade do teste utilizado para detecção do reservatório animal, uma vez que essa propriedade interfere no valor preditivo positivo do teste. De fato, a história demonstra a preocupação dos pesquisadores com essa questão, como o trabalho desenvolvido por Silva³⁶ com antígenos mais específicos ou mesmo a aplicação da técnica do PCR para o diagnóstico da LV canina.

Entretanto, mesmo a utilização de técnicas mais sensíveis e específicas ainda apresentaria resultados falsos positivos, no contexto da epidemia de Belo Horizonte, ou de qualquer outra área que conviva com valores baixos de prevalência da doença.

A identificação e sacrifício do cão são atividades preconizadas pelo MS para o controle da LV humana. Essa recomendação está respaldada, dentre outras, na consideração de que o cão é um importante reservatório da doença para o ser humano e na demonstração de que a doença canina precede a doença humana, sendo a primeira um dos responsáveis pelo avanço tanto espacial como temporal da segunda. Na epidemia de LV em Belo Horizonte, essa associação foi muito bem demonstrada no trabalho de Oliveira et al.⁴²

Nesse contexto, para que as ações de controle da doença humana sejam efetivas e al-

cancem resultado adequado, é inevitável o sacrifício de animais falsos positivos. A crítica ou insatisfação geradas com o sacrifício de animais assim caracterizados pode ser minimizada se considerarmos que a menor especificidade da RIFI é devida, em parte, à existência de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, como a doença de Chagas e a LTA, ou seja, os animais falsos positivos para LV, podem ser, por seu turno, positivos para essas enfermidades. Da mesma forma que para a LV canina, o sacrifício do cão positivo para doença de Chagas e LTA também é recomendado por não existir tratamento eficaz e o animal também constituir importante reservatório dessas doenças para o ser humano.

Apesar de ser esse o aspecto privilegiado na contestação das ações de controle da LV humana desenvolvidas pela prefeitura de Belo Horizonte, a existência de animais falsos negativos é um problema que também chama a atenção. Considerando o valor preditivo negativo da RIFI, mesmo atingindo valor elevado como 99,5%, no período de 1993 a 1997, foram detectados 2.003 animais falsos negativos e que, assim, não foram sacrificados. Não se pode deixar de considerar que a permanência desses animais no ambiente epidêmico pode certamente ter comprometido a eficácia do programa de controle da LV em Belo Horizonte, contribuindo para a manutenção de focos da doença e, conseqüentemente, fontes de infecção para pessoas e outros cães.

Comentários

Os dados relativos à morbidade da LVA no país não são precisos, o que dificulta as estratégias de controle a serem adotadas nas regiões onde a doença ocorre. Inquéritos epidemiológicos baseados no diagnóstico laboratorial, em populações humanas e caninas sob risco de transmissão, são necessários para avaliar a extensão do problema. Os profissionais e pesquisadores se esbarram na escolha de um método apropriado, simples, sensível e específico, que possibilite o diagnóstico não apenas dos casos avançados, mas também dos iniciais, oligossintomático e assintomáticos.

A partir de trabalhos de pesquisadores brasileiros, como Chagas, Deane & Deane e Alençar, demonstrando a importância dos cães na transmissão da LV, os estudos sorológicos de cães infectados vêm aumentando. Visando a obter melhores resultados e métodos diagnósticos que facilitem a realização de inquéritos epidemiológicos, assim como, melhor conhe-

cimento da distribuição geográfica, cientistas vêm desenvolvendo técnicas cada vez mais sensíveis, específicas e de fácil execução.

Observa-se, apenas recentemente, o progresso e aperfeiçoamento de técnicas para o diagnóstico da LV humana e canina como objeto de interesse de pesquisas nacionais e internacionais. O que diverge da constatação de que os indicadores de morbi-mortalidade desse agravo são indubitavelmente alarmantes em nosso meio e em outros países em desenvolvimento já há muitas décadas.

A avaliação dos valores preditivos é um raciocínio elaborado pelo clínico, notadamente quando se considera a recomendação de tratamentos que possam representar altos investimentos ou riscos à saúde.

No caso da LV canina, zoonose com repercussão considerável na saúde humana, os valores preditivos dos testes teriam um pequeno significado, uma vez que não há tratamento eficaz contra a doença, sendo considerada incurável até o momento.

Os indicadores de sensibilidade e especificidade de um teste devem ser, por sua vez, analisados atentamente quando da escolha de um teste diagnóstico para ser utilizado num programa de controle de qualquer enfermidade.

Para a LV canina, um teste que apresente elevada sensibilidade deve ser preferido para os inquéritos epidemiológicos. Esta medida visa a obter uma menor taxa de cães falsos negativos. A alta sensibilidade evitaria que animais positivos não permanecessem como fontes de infecção para o vetor e desse para o ser humano e outros animais.

O indicador especificidade deve também ser observado e ser, preferencialmente, o mais elevado possível. Entretanto, a existência de animais falsos positivos, para a eficiência de um programa de controle, é menos problemática, podendo-se recomendar para os inquéritos caninos testes com especificidade menor, quando comparada com a sensibilidade.

A RIFI, teste indicado pelo MS para levantamentos epidemiológicos e diagnósticos da LV canina, reúne essas características: valores elevados de sensibilidade (90-100%) e valores menores de especificidade (80%) para amostras de soro. Adicionalmente é conhecido que a identificação de indivíduos falsos positivos pela RIFI se deve a reações cruzadas entre LV e duas outras importantes zoonoses: LTA e doença de Chagas.

Esse fato pode ser inconveniente quando os objetivos são os levantamentos epidemiológicos e o conhecimento da distribuição espacial da LV, da LTA ou da doença de Chagas nos reservatórios caninos, já que as áreas de concomitância dessas doenças são comuns em nosso país.

Por outro lado, as falhas de especificidade das técnicas são minimizadas pois as três zoonoses, endêmicas no Brasil, apresentam a espécie canina como reservatórios do parasita e fontes de infecção para o ser humano e outros animais, não havendo tratamento eficiente para as enfermidades caninas. Portanto, faz-se necessário a conseqüente eliminação (sacrifício) dos animais infectados para se alcançar resultados efetivos nas ações de controle relacionadas a esses agravos.

Resumo

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) apresenta quadros graves de endemias e epidemias havendo, nos últimos anos, uma propagação da doença por vários estados que antes não possuíam casos de pessoas e animais. O Ministério da Saúde recomenda, para os inquéritos caninos, o uso da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), apresentando sensibilidade de 90-100% e especificidade de 80% para amostras de soro. A utilização da RIFI pode comprometer a efetividade do Programa de Controle do Calazar por estar deixando de detectar e sacrificar animais infectados (falsos negativos). Por outro lado, o programa estaria identi-

cando e recomendando o sacrifício de animais não infectados (falsos positivos). Essas incertezas já geraram atitudes como a não indicação do sacrifício de animais positivos e a recomendação de tratamento desses animais por parte de clínicos veterinários. Este trabalho tem como objetivo refletir sobre a qualidade do diagnóstico de inquéritos epidemiológicos caninos, tendo como pano de fundo a epidemia de LV que ocorre no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais, desde 1993.

Leishmaniose Visceral; Diagnóstico; Cães

Colaboradores

W. A. Alves dedicou-se ao levantamento bibliográfico para o trabalho e elaborou a parte referente ao referencial teórico, e P. D. Bevilacqua foi responsável pela redação da discussão, revisão final do texto e adequação às normas dos *Cadernos de Saúde Pública*.

Referências

1. Pessoa SB, Martins AV. Parasitologia médica. 11a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.
2. Badaró R, Duarte MIS. Leishmaniose visceral (calazar). In: Veronesi R, Focaccia R, organizadores. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 1234-59.
3. Genaro O. Leishmaniose visceral. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM, organizadores. Parasitologia humana. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu; 2000. p. 56-72.
4. Silva JR. Leishmaniose visceral (calazar). Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária; 1957.
5. Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil, estudos sobre reservatório e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária; 1956.
6. Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Toledo LM, Grimaldi Júnior G, Momen H. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). Mem Inst Oswaldo Cruz 1985; 80:349-57.
7. Costa CH, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. Rev Saúde Pública 1990; 24:361-72.
8. Secretaria Municipal de Saúde. Leishmaniose visceral. Belo Horizonte: Secretaria Municipal de Saúde; 1994.
9. Cosenza GW. Leishmaniose visceral em Belo Horizonte. Boletim epidemiológico 1995; 4:4-6.
10. Oliveira CDL, Pessanha JE, Costa IO. Histórico das ações e metodologias propostas e adotadas no controle da leishmaniose visceral no Município de Belo Horizonte, 1993 a 1998. Belo Horizonte: Secretaria Municipal de Saúde; 1998.
11. Ministério da Saúde. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998. Boletim Epidemiológico 1999; 3 (Edição Especial).
12. Wolday D, Berhe N, Akuffo H, Britton S. Leishmania-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. Parasitol Today 1999; 15:182-7.
13. World Health Organization. The current global situation of HIV/AIDS pandemic. Wkly Epidemiol Rec 1997; 72:357-60.
14. Adler S, Theodor O. Investigations on mediterranean kala-azar. VI. canine visceral leishmaniasis. Proc R Soc Lond 1932; 110:402-12.
15. Nussenzweig V, Nussenweig RS, Alencar JE. Leishmaniose visceral nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará: inquérito sorológico utilizando a reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo de tuberculose. Observações sobre o diagnóstico e epidemiologia da doença. O Hospital 1957; 52:47-69.
16. Flemmings BJ, Pappas MG, Keenan CM, Hockmeyer WT. Immune complex decomplexation of canine sera for use in a complement – fixation test for diagnosis of visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1984; 5:553-9.
17. Hockmeyer WT, Welde BT, Sabwa CLA. Complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen I. Ann Trop Med Parasitol 1984; 78:489-93.
18. Pappas MG, Hajkowski RR, Cannon LT, Hockmeyer WT. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-Elisa): comparison with standard Elisa and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. Vet Parasitol 1984; 14:239-49.
19. Smith DH, Welde BT, Sabwa CL, Reardon MJ, Hockmeyer WT. A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen II. Results in an endemic area in Kenya. Ann Trop Med Parasitol 1984; 78:495-500.
20. Pappas MG, Cannon LT, Hockmeyer WT, Smith DH. Evaluation of complement fixation procedures for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 1985; 79:147-51.
21. Mohammed AR, Wright EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of Elisa-Imunofluorescence and indirect haemagglutination. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80:271-4.
22. Harith AE, Kolk AHJ, Laarman JJ. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and Elisa. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987; 81:603-6.
23. Costa CA, Genaro O, Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick MSM, et al. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. Rev Soc Bras Med Trop 1991; 24:21-5.
24. Fernández-Pérez FJ, Mendez S, Fuent C, Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M, Aluanda JM. Short re-

- port: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:652-3.
25. Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. The micro-Elisa technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72:213-8.
 26. Pappas MG, Hajkowski RR, Diggs CL, Hockmeyer WT. Development of an antigen conservative enzyme immunoassay (Dot-Elisa) for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:425-6.
 27. Nurit-Rachamin S, Jaffe CL. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Ann Trop Med Parasitol* 1988; 85:503-8.
 28. Scott JM, Shreffler WG, Ghalib HW, Badaró R, Reed SG. A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44:272-7.
 29. Cabrera GP, Silva VO, Costa RT, Genaro O. The fucose mannose ligand-Elisa in the diagnosis and prognoses of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:296-301.
 30. Chatterjee M, Baneth G, Mandal C. Diagnostic and prognostic potential of antibodies against o-acetylated sialic acids in canine visceral leishmaniasis in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 70:55-6.
 31. Jaffe CL, Zalis M. Use of purified parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1988; 157:1212-20.
 32. Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM. rK39: a clone antigen *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996; 173:758-62.
 33. Ozenzoy S. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:363-9.
 34. Safi SH, Evans DA. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83:334-7.
 35. Evans TG, Vasconcelos AB, Vasconcelos AW. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42:118-23.
 36. Silva JCF. Leishmaniose visceral canina no Município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 1997.
 37. Lacerda MM. The Brazilian leishmaniasis control program. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:489-95.
 38. Ministério da Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). 2ª Ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1996.
 39. Bevilacqua PD. Leishmaniose visceral: interesses públicos e interesses privados na construção social de uma epidemia em Belo Horizonte [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 1999.
 40. Soares JF, Siqueira AL. Introdução à estatística médica. 1ª Ed. Belo Horizonte: Departamento de Estatística, Universidade Federal de Minas Gerais; 1999.
 41. Silva ES, Gontijo CME, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96:285-91.
 42. Oliveira CDL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública* 2001; 17:1231-9.

Recebido em 18/Fev/2003

Versão final reapresentada em 08/Ago/2003

Aprovado em 23/Out/2003