

SANDRA CRISTINA BARÃO

**“PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi*
EM ÁREA DE AUTOCTONIA RECENTE,
ARAÇATUBA/SP”**

CAMPINAS

Unicamp

2007

SANDRA CRISTINA BARÃO

**“PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi*
EM ÁREA DE AUTOCTONIA RECENTE,
ARAÇATUBA/SP”**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

Orientadora: Profa. Dra. Mariângela Ribeiro Resende

Campinas

Unicamp

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B231p Barão, Sandra Cristina
Prevalência da infecção por *Leishmania chagasi* em área de autoctonia recente, Araçatuba / SP. / Sandra Cristina Barão. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores : Mariângela Ribeiro Resende
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Estudos soroepidemiológicos. 2. Doenças endêmicas. 3. Fatores socioeconômicos. 4. Calazar. 5. Prevalência. 6. Leishmaniose Visceral. 7. Sorodiagnóstico. 8. Infecção assintomática. 9. Anticorpos antiprotozoários. I. Resende, Mariângela Ribeiro. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : "Leishmania chagasi infection prevalence in recent autoctone area Araçatuba/SP"

Keywords: • **Seroepidemiologic Studies**
• **Endemic diseases**
• **Socioeconomic factors**
• **Prevalence**
• **Leishmaniasis Visceral**
• **Serodiagnostic**
• **Asymptomatic infection**
• **Antigens, Protozoan**

Área de concentração : Ciências Básicas

Titulação: Doutor em Clínica Médica

**Banca examinadora: Prof^o. Dr^o Mariângela Ribeiro Resende
Prof. Dr. Carlos Magno Castelo
Prof^a. Dr^a. Carolina Guilherme Prestes Beyrodt
Prof^o. Dr^o. Maria Rita Donelísio Cordeiro
Prof. Dr Plínio Trabasso**

Data da defesa: 17-12-2007

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof^a Dr^a. Mariângela Ribeiro Resende

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

2. Prof(a). Dr(a). Carolina Guilherme Prestes Beyrodt

3. Prof(a). Dr(a). Maria Rita Donalísio Cordeiro

4. Prof(a). Dr(a). Plínio Trabasso

5. Prof.(a). Dr(a). Mariângela Ribeiro Resende

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 17/12/2007

DEDICATÓRIA

Para minha MÃE e meu FILHO.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mariângela Ribeiro Resende

Ao Prof. Dr. Luiz Jacintho da Silva

Ao Prof. Dr. Benilton Carvalho

À Profa. Maria Antônia Domingos

À Dra. Vera Lúcia Fonseca de Camargo-Neves

Ao Superintendente da SUCEN – Regional 09 de Araçatuba, Clóvis Pauliqueves

À Lílian Aparecida Colebrusco Rodas

À Neuza Fernandes Chierici

À Lucilene Lehman de Paula

À toda equipe de campo da Regional 09 de Araçatuba

“Tudo que realmente é valioso só pode ser realizado através da ação impessoal e coletiva.”

Albert Einstein (1879-1955)

	PÁG.
RESUMO	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
1.1- Etiologia e Epidemiologia	19
1.2- Apresentação Clínica	22
1.3- Diagnóstico de LV ativa e de infecção por <i>Leishmania spp</i>	23
2- OBJETIVOS	28
3- SUJEITOS E MÉTODOS	30
3.1- Desenho do Estudo	31
3.2- Período de Estudo	31
3.3- Local	31
3.4- População	36
3.5- Métodos	36
4- RESULTADOS	41
4.1- Descrição das Áreas e População	42
4.2- População Canina	44
4.3- Resultados dos Testes Sorológicos com Antígeno rK39	46
5- DISCUSSÃO	51
5.1- Prevalência de Infecção por <i>Leishmania chagasi</i>	52
5.2- Proporção entre Infecção e casos de Leishmaniose Visceral	53
5.3- Fatores Associados à Infecção por <i>Leishmania chagasi</i>	54
5.4- Utilidade do Teste Imunocromatográfico com Antígeno rK39	55

6- CONCLUSÃO.....	59
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8- ANEXO.....	71
Anexo 1- Ficha para levantamento preliminar das condições sanitárias dos imóveis.....	72
9- APÊNDICES.....	73
Apêndice 1- Questionário de Identificação.....	74
Apêndice 2- Termo de Consentimento.....	75
Apêndice 3- Artigo.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área
Ag-rK39	Antígeno recombinante K39
DAT	Teste de Aglutinação Direta
ELISA	Teste imunoenzimático
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPTU	Imposto Predial e Territorial Urbano
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose Muco cutânea
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
OMS	Organização Mundial de Saúde
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Notificações de LVA em Araçatuba, de 1999 a 2004, segundo a área e setor.....	35
Tabela 2- Distribuição dados demográficos da população humana em A1..	42
Tabela 3- Distribuição dos dados demográficos da população humana em A2.....	43
Tabela 4- Tempo médio de residência dos habitantes testados nas áreas 1 e 2.....	43
Tabela 5- Distribuição das morbidades/condições associadas de acordo com a área avaliada.....	43
Tabela 6- Descrição da dinâmica da população canina nas áreas avaliadas nos últimos 2 anos.....	44
Tabela 7- Características das áreas externas dos imóveis em A1 e A2.....	45
Tabela 8- Distribuição dos outros animais, domésticos de estimação ou para consumo, segundo a área.....	45
Tabela 9- Distribuição dos resultados dos testes utilizando o antígeno recombinante K39 na A1, de acordo com a faixa etária e sexo.....	46
Tabela 10- Distribuição dos resultados dos testes utilizando o antígeno recombinante K39 em A2, de acordo com a faixa etária e sexo...	47
Tabela 11- Resultados positivos relacionados com as morbidades e condições associadas encontradas nas duas áreas.....	47
Tabela 12- Relação dos resultados do teste rK39 de acordo com a presença e letalidade canina por domicílio na A1 (n=47).....	48

Tabela 13-	Relação dos resultados do teste rK39 de acordo com a presença e letalidade canina por domicílio na A2 (n=50).....	49
Tabela 14-	Relação dos resultados do teste rK39 de acordo com a presença e letalidade canina entre os moradores da área 1 (n=125).....	49
Tabela 15-	Relação dos resultados do teste rK39 de acordo com a presença e letalidade canina entre os moradores da área 2 (n=125).....	49
Tabela 16-	Relação entre os resultados do teste com Ag-rK39 e variáveis de interesse e categorização.....	50

	PÁG.
Figura 1- Figura 1: Mapa do estado de São Paulo dividido por municípios. A área mais escura representa o município de Araçatuba.....	31
Figura 2- Figura 2: Mapa esquematizado da área urbana de Araçatuba com parte da divisão em áreas e setores. As regiões em amarelo representam as áreas 1 e 2 estudadas.....	32
Figura 3- Fotografia de uma casa característica da área 1 (A5s5).....	33
Figura 4- Fotografia de uma casa característica da área 2 (A3s).....	34
Figura 5- Sequência do processamento do teste rápido com antígeno rK39.....	38
Figura 6- Sequência do processamento do teste rápido com antígeno rK39.....	38
Figura 7- Sequência do processamento do teste rápido com antígeno rK39.....	38
Figura 8- “Dipsticks” do teste rápido com rK39. O resultado positivo (fita superior) apresenta duas bandas de cor avermelhada; enquanto o resultado negativo (fita inferior) mostra apenas uma banda controle (lado esquerdo).....	39

LISTA DE GRÁFICO

	PÁG.
Gráfico 1- Distribuição dos casos notificados e óbitos por LV em Araçatuba/SP.....	22

RESUMO

As informações que existem acerca da leishmaniose visceral humana, provêm em sua maioria das notificações realizadas nas áreas de alta endemicidade. Por isso, ainda há muitos aspectos a respeito da transmissão urbana e dos quadros de infecção assintomática que precisam ser elucidados. O dimensionamento real da prevalência da infecção por *Leishmania chagasi* pode contribuir para a definição e avaliação do impacto das medidas de controle. Com o objetivo de determinar a prevalência da infecção por *L. chagasi* em área de autoctonia recente, município de Araçatuba e, avaliar os fatores associados em relação aos casos humanos de leishmaniose visceral notificados, foi realizado um estudo transversal, com amostra estratificada de fase única, realizada em duas áreas urbanas de níveis sócio-econômicos distintos, designadas A1 (periférica, menor nível sócio-econômico) e A2 (central, melhor nível sócio-econômico). A soroprevalência foi avaliada com a utilização do teste imunocromatográfico com antígeno recombinante K39 (Ag-RK39). A prevalência observada foi de 18,4% (23/125) em A1 e 4,8% (6/125) em A2. A proporção entre indivíduos assintomáticos e casos de doença ativa nas áreas 1 e 2 foram respectivamente 1,35:1 e 2:1. Não houve diferença significativa da soropositividade na distribuição por idade, nem por sexo, entre as áreas. Contudo, foi observada diferença na proporção de casos assintomáticos entre as áreas, possivelmente associada aos níveis sócio-econômicos e intensidade de transmissão. Também houve relação com a presença canina nos últimos dois anos e a soropositividade para o Ag-rK39. As informações obtidas sugerem a associação da soroprevalência à presença canina nos dois últimos anos e reforça a estratégia de controle adotada.

ABSTRACT

Many information exist about human visceral leishmaniasis are origin to the pontificated cases, moreover, almost all data substantiating derive high levels transmission. So, there are many aspects about the urban transmission and asymptomatic infection to need to elucidated. The real comprehensive measurements about the *Leishmania chagasi* infection to be able to contribute to improve the assessment impact about the measures control. The objective to this study was determining the prevalence of asymptomatic visceral leishmaniasis infection in Araçatuba city, a recent autoctone area. This was a cross-sectional survey on a random sample of the population in two urban different areas, called A1 (outskirts, low social-economic condition) and A2 (central, good social-economic condition). The seroprevalence was assessing by the Immunochromatographic test with recombinant antibody K39 dipstick. The prevalence was 18.4% (23/125) in A1 and 4.8% (6/125) in A2. And the proportion between the asymptomatic and active disease in areas 1 and 2 was 1.35:1 and 2:1, respectively. There was no significant difference in age, nor gender, distribution of seropositivity between the areas. But we observed a difference in asymptomatic infection rates between the two areas, possibly associated with socioeconomic levels and transmission intensity. The data from this study suggest an associate between the human symptomatic seroprevalence and the presence of dogs in last two years old.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Etiologia e Epidemiologia

Leishmaniose é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Este protozoário pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae. No gênero *Leishmania* existem mais de 20 espécies distribuídas em regiões de clima tropical e subtropical de todo o Mundo, com exceção da Oceania. E, existem ainda dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, os quais indicam a região do tubo digestivo onde o promastigota se desenvolve até atingir a fase metacíclica infectante (Lainson e Shaw, 1992).

Esta parasitose é considerada uma zoonose, sendo o Homem um hospedeiro susceptível que adquire a infecção ao entrar em áreas enzoóticas (Ashford, 1997).

A leishmaniose visceral (LV) é conhecida há muito tempo no Oriente por “kala-azar” (febre negra), por apresentar febre irregular e escurecimento da pele. Seu agente etiológico foi descoberto somente no início do século XX, quando, separadamente, Willian Leishman e Charles Donovan, verificaram a semelhança de formas amastigotas que foram observadas em material de calazar indiano, como as descritas por Borvsky em 1898.

Há divergências quanto à origem da leishmaniose visceral no continente americano. Alguns pesquisadores afirmam que o parasita, *Leishmania chagasi*, é uma sinonímia para *L. infantum*, que teria sido aqui introduzido após a chegada dos europeus e adaptou-se a transmissão pelo vetor *Lutzomya longipalpis*. Outros pesquisadores defendem a chegada do protozoário muito antes dos colonizadores (Lainson *et al.*, 1987; Mauricio *et al.*, 1999; 2000). Para suas conclusões esses especialistas utilizam aspectos ecológicos, evolutivos e técnicas moleculares, mesmo com tais ferramentas mais as divergências continuam, Maurício e colaboradores (1999; 2000) concluíram que o agente da leishmaniose visceral americana é idêntico a *L. infantum*, porém ainda não há consenso.

Também há divergência na classificação das espécies de *Leishmania*. Devido ao grande número de espécies de *Leishmania* e das dificuldades para identificá-las são utilizadas características intrínsecas e extrínsecas, como o desenvolvimento do parasito no

vetor (Grimaldi e Tesh, 1995; Shaw, 1994). Laison e Shaw introduziram a divisão em complexos, que não é uma unidade formal da taxonomia, mas mostrou ser de grande utilidade para a melhor organização das espécies. Deste modo as espécies causadoras da LV são agrupadas no Complexo Donovan, formado por: *L. donovani*, na Índia, Bangladesh, Paquistão e Nepal; *L. infantum*, na região Mediterrânea (Europa e África) e *L. chagasi* em diferentes países da América (Novo Mundo) (Laison, 1983).

No Brasil 90% dos casos de LV estão em estados da região nordeste (Brasil- MS-SVS, 2007; Palatinick-de-Souza *et al*, 2001; Cunha *et al*, 1995), entretanto dissemina-se pelo país e alcança áreas anteriormente livres do parasito, como é o caso da região sudeste.

Todas as espécies são transmitidas pela picada de dípteros da Família Phlebotominae, havendo relação espécie-específica entre parasito e vetor (Lainson & Shaw, 1992). O parasito na sua forma amastigota, dentro de macrófagos, é ingerido juntamente com o sangue do hospedeiro vertebrado. Os reservatórios silvestres são principalmente pequenos roedores, enquanto que em ambiente urbano o reservatório é o cão (World Health Organization - WHO, 1990; Dietze *et al.*, 1997; Palatinick-de-Souza *et al*, 2001). No tubo digestivo do invertebrado, o protozoário passa por modificações e assume a forma promastigota, que será inoculada em outro vertebrado, mamífero, durante o repasto sangüíneo da fêmea do flebotomíneo.

Em novos focos de disseminação desta parasitose, os casos caninos precedem os humanos. Estes animais, que compartilham o ambiente doméstico, apresentam maior parasitemia, podendo ser observado células infectadas em amostras de pele e sangue, que facilita a infecção dos vetores, que fecham o ciclo ao realizar novos repastos sangüíneos em serem humanos (Sherlock, 1996; Ikeda-Garcia *et al.*, 2007).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), excetuando-se os casos de LV por *L. donovani* na Índia, onde o reservatório é o próprio homem, o principal reservatório da LV para *L. chagasi* e *L. infantum* são os cães (WHO, 1990; Wijeyaratne *et al.*, 1994, Boelaert *et al.*, 2000), provavelmente devido ao maior ataque do vetor aos

animais que a pessoas, ou ainda, pela alta parasitose que os cães desenvolvem, apresentando parasitas na pele e sangue em quantidades altas (Laison, 1983).

De acordo com a última avaliação apresentada pela OMS, calculou em 350 milhões o número de indivíduos expostos ao risco de infecção e dois milhões de novos casos por ano.

Destes, 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea (LC) e aproximadamente 500.000 de leishmaniose visceral (WHO, 1990; Desjeux, 2004). No Brasil, foram notificados, em média nos últimos 10 anos, cerca de 30 mil casos de LC e 3.000 de LV por ano (MS - SVS, 2007b).

Novos focos de leishmaniose emergem e expandem rapidamente acompanhando o movimento das populações (Wijeyaratne *et al.*, 1994). Esta urbanização de parasitoses rurais é conseqüência de um fenômeno relativamente novo (Mott, 1991). A migração anterior ao surgimento da LV é descrita por Costa e col (1990) em Teresina (PI) no início da década de 1980, Cunha e col em Monte Gordo no final da década de 1980 (Cunha *et al.*, 1995), Jerônimo e col em Natal no início da década de 1990 (Jerônimo *et al.*, 1994) e em Araçatuba posteriormente (Camargo – Neves *et al.*, 2003). Encontrando um ambiente com clima adequado à proliferação do vetor, a presença abundante de cães como hospedeiros e finalmente uma população humana suscetível, a expansão ocorre rapidamente (Mott *et al.*, 1991; Jerônimo *et al.*, 1994).

No final da década de 90 surgiram os primeiros casos autóctones desta doença em Araçatuba, município do estado de São Paulo. Esta cidade, localizada no Planalto Ocidental Paulista, distante da capital 530 km por rodovia e a pouco mais de 100 km dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, possui aproximadamente 170 mil habitantes e 100% de esgoto coletado e tratado (Prefeitura Municipal de Araçatuba, 2007). Nesta região não havia referências da presença do protozoário, *L. chagasi*, nem do vetor, *Lutzomyia longipalpis*, responsável pela transmissão desta espécie de *Leishmania*. O vetor foi encontrado pela primeira vez em 1997 (Costa *et al.*, 1997) e, logo a seguir foram notificados os primeiros casos caninos e humanos, respectivamente em 1998 e 1999 (São Paulo, 2007). Em 1998, segundo a série histórica de notificações foram reportados

apenas dois casos. Houve uma ascensão de até 52 notificações com 6 óbitos em 2002. Houve um declínio nos anos subseqüentes, porém com nova ascensão, sendo que durante 2007 foram registrados 35 casos e 4 óbitos (MS-SVS 2007b).

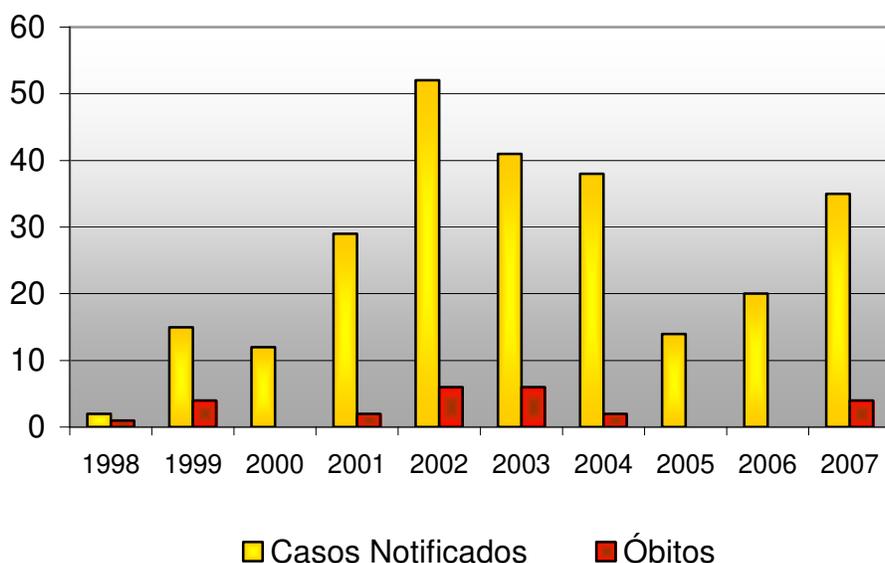


Gráfico 1- Distribuição dos casos notificados e óbitos por LV em Araçatuba/SP.

1.2- Apresentação Clínica

A forma clínica mais comum e com maior prevalência é a LC, podendo apresentar variações como a leishmaniose muco cutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). A leishmaniose cutânea apresenta uma única lesão ulcerada, simples, no local da picada do flebótomo, ou com pequenas lesões (satélites) próximas. A aparência das lesões, o período de incubação e a resposta ao tratamento variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida.

Na forma muco cutânea, causada apenas pela espécie *L. braziliensis*, ocorre o comprometimento de mucosa naso-faríngea, mesmo após anos de cura de uma lesão cutânea original. Enquanto na forma mais rara, a leishmaniose cutânea difusa (LCD) não há formação de úlceras. Neste caso ocorre a formação de placas, pápulas ou verrugas por todo

o corpo. Esta forma é de difícil tratamento, apresentando elevado índice de recidiva (Badaró e Johnson Jr, 1993).

A leishmaniose visceral é a forma mais severa desta parasitose, caracterizada pelas manifestações clínicas das leishmanias do Complexo Donovanii no sistema reticular endotelial. O espectro da infecção pela *L. chagasi* é amplo e se relaciona à resposta do organismo: reação local com destruição do parasito fagocitado, fagocitose por macrófagos e interação parasito-hospedeiro - com persistência do parasito no organismo de forma latente por tempo indeterminado e multiplicação dos parasitos nos macrófagos com disseminação para o sistema retículo endotelial - determinando formas oligossintomáticas até a síndrome completa de hepatoesplenomegalia febril, anemia e desnutrição protéico-calórica. Quando não tratada esta forma apresenta letalidade de até 95%.

1.3- Diagnóstico de LV ativa e de infecção por *Leishmania spp*

Em virtude do quadro clínico de LV ser confundido, sobretudo nas fases iniciais com outras doenças infecciosas, a identificação da *Leishmania chagasi* ou outras espécies do complexo donovani (Badaró *et al*, 1986a; Guerin *et al.*, 2002) faz-se necessária para a confirmação da doença e instituição da terapêutica específica (Choudhury *et al.*, 1991).

O exame considerado como “padrão-ouro” ainda é a observação direta ao microscópio do parasito dentro de células do sistema mononuclear fagocitário. Em espécimes obtidos por punção esplênica, ou de medula óssea ou linfonodos, em ordem decrescente de sensibilidade (WHO, 1990; Berman, 1997; Guerin *et al.*, 2002). Estas técnicas diagnósticas se prestam exclusivamente para a confirmação de casos suspeitos de doença ativa, portanto não são úteis como instrumento para a detecção de infecção assintomática, de cunho epidemiológico.

Também é conclusiva a observação das formas promastigotas, obtidas de cultura das amostras dos tecidos anteriores, em meio Novy-McNeal-Nicolle (NNN) após um período de incubação e preparo de lâminas com esfregaço e coloração com Giensa ou Romanowsky (Alvar *et al.*, 2004).

A detecção de infecção assintomática tem sido realizada através do teste cutâneo de hipersensibilidade tardia, teste de Montenegro, e de técnicas sorológicas.

O teste de Montenegro é muito utilizado para LC e em inquéritos epidemiológicos pela simplicidade de aplicação, facilidade de leitura, além de baixo custo. Porém, não é eficiente para o diagnóstico de LV uma vez que permanece negativo durante a fase avançada da doença, revertendo somente após a cura (Berman, 1997). Além de possuir baixa especificidade, pois apresenta reação cruzada entre as espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*.

Dentre os testes sorológicos, a Fixação de Complemento foi um dos primeiros desenvolvidos para o diagnóstico de LV (Duxbury e Sadun, 1964). Este teste muito utilizado tanto para humanos quanto para cães, apresenta boa sensibilidade, com o inconveniente de apresentar reação cruzada com Doença de Chagas, e atualmente tornou-se obsoleto.

Em 1964, Shaw e Voller desenvolveram o teste de imunofluorescência (Shaw & Voller, 1964), princípio utilizado até hoje nos laboratórios de análises clínicas (Laboratório Fleury, 1996; 2007). Esta técnica necessita de microscópio para fluorescência, equipamento incomum em regiões pobres onde a LV é endêmica. Também apresenta reação cruzada com outros tripanosomatídeos, assim não pode ser utilizado como único exame para conclusão diagnóstica em áreas de sobreposição de leishmaniose e Doença de Chagas.

Outras técnicas foram adaptadas para leishmanioses com a finalidade de aumentar a sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos, entretanto todas apresentaram limitações inerentes.

Entre esses processos, o Teste da Aglutinação Direta (DAT), desenvolvido por Allain & Kagan (1975), inicialmente apresentou baixa especificidade, pois utilizava antígeno bruto obtido de promastigotas fixados em formalina. Desde então, diferentes modificações foram propostas, melhorando o desempenho do teste, porém sem conseguir facilitar o preparo e disponibilização do antígeno para os exames (Harith *et al.*, 1986; Jaffe

e Zalis, 1988). A purificação de antígenos de espécies de *Leishmania* causadoras do quadro visceral para a utilização desta técnica aumentou significativamente a especificidade (Jaffe e Zalis, 1988). Entretanto, nas áreas onde ocorre tanto LV como outros tripanosomatídeos como *T. cruzi* o resultado positivo de um DAT não é suficiente para conclusão do diagnóstico.

Na década de 1990 a OMS incentivou pesquisas com o objetivo de aumentar a estabilidade do antígeno utilizado para o DAT (Modabber, 1993). Assim, entre outras modificações, Rab e Evans (1997) testaram, no Paquistão, a utilização do papel de filtro para a coleta de amostras de sangue. Neste país, a LV por *L. infantum* é endêmica, atingindo principalmente crianças. A facilidade para obter as amostras sem necessidade de punção venosa devido a tal modificação, foi um grande passo para a utilização deste teste em inquéritos epidemiológicos, sem causar alteração na estabilidade e sensibilidade. Contudo, Boelaert e colaboradores consideram que, apesar da sensibilidade (95 a 97%) e especificidade (78 a 94%) deste teste serem satisfatórias, é necessário que as condições ambientais sejam controladas para atingir um nível aceitável de reprodutibilidade dos resultados (Boelaert *et al.*, 1999; 2000). Mesmo assim, o DAT vem sendo amplamente utilizado nos últimos 15 anos (Hailu *et al.*, 2002).

O teste imunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) também tem sido objeto de incentivo pela OMS (Modabber, 1993). Desde as primeiras tentativas, no final da década de 70, após verificar sua eficiência para diferentes protozoonoses como malária e toxoplasmose (Hommer *et al.*, 1978), o ELISA passou por diferentes adaptações técnicas a fim de se tornar eficiente também para o diagnóstico de LV. Um dos inconvenientes da técnica de ELISA é a dificuldade de padronização, pois o modo de preparo do antígeno varia e, com isso, também varia a sensibilidade e especificidade. O antígeno pode ser bruto ou purificado, ou ainda originado de promastigotas ou amastigotas (mais difícil obtenção). Com o intuito de atingir os objetivos básicos de um teste eficiente, simples, rápido e sensível, com poucos recursos laboratoriais, Pappas e colaboradores desenvolveram o Dot-ELISA para LV (Pappas *et al.*, 1984). Conseguiram uma sensibilidade e especificidade equivalente ao ELISA, com um tempo de incubação muito menor e dispensando a necessidade de uso de espectrofotômetro. Porém a

busca pelo melhor método não cessou. Em 1985, Mohammed e colaboradores (Mohammed *et al.*, 1985) testaram a utilização de promastigotas intactos, obtidos de cultura *in vitro*. E, em 1986, Badaró e colaboradores demonstraram a especificidade do antígeno utilizado com a espécie de *Leishmania* encontrada na área a ser pesquisada, diminuindo as reações cruzadas com *T. cruzi* nas regiões onde ocorre a sobreposição das duas parasitoses (Badaró *et al.*, 1986a). Em 1990, Reed e colaboradores trocaram o conjugado com o anticorpo anti-IgG por um conjugado com a proteína A ou G, assim obtiveram melhora na especificidade, o que proporcionou aumento da diferença visual entre os resultados positivo e negativo e, permitiu a utilização tanto de soro quanto sangue (Reed *et al.*, 1990). Mas, ainda não há um “kit” para ELISA comercialmente viável para a LV (Guerin *et al.*, 2002).

Em 1993, Burns e colaboradores isolaram uma kinesina, de 230kDa, com uma repetição de 39 aminoácidos, muito conservada entre as espécies de *Leishmania* do complexo Donovanii, a K39 (Burns *et al.*, 1993). E, rapidamente criaram uma proteína recombinante, a rK39, utilizada em testes sorológicos que apresentaram alta sensibilidade e especificidade (Qu *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1995; Badaró *et al.*, 1996). A utilização de “dipsticks” impregnados com Ag-rK39, a fim de tornar o exame ainda mais rápido e prático, já é descrito por Sundar e colaboradores em 1998, com sucesso (Sundar *et al.*, 1998). Esta forma de aplicação foi testada em diferentes locais como o Nepal no ano de 2000, por Bern e colaboradores, Venezuela em 2001, por Delgado e colaboradores e no Sudão, por Zijlstra e colaboradores em 2001 (Bern *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2001; Zijlstra *et al.*, 2001), sendo que todos relatam alta sensibilidade e especificidade, mesmo em área com outras tripanossomíases, como na Venezuela. Nestes dois últimos trabalhos, Delgado e Zijlstra, realizaram com soro de pacientes já diagnosticados por outros métodos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e DAT. Outras comparações a respeito da eficiência do teste rápido com Ag-rK39 com DAT são avaliadas, novamente, por Veeken e colaboradores, no Sudão e por Chappuis e colaboradores no Nepal (Veeken *et al.*, 2003; Chappuis *et al.*, 2003).

No Sudão e na Índia o Ag-rK39 é utilizado e recomendado em inquéritos epidemiológicos (Boelaert *et al.*, 2004; Sundar *et al.*, 2006b). Enquanto no Brasil, este teste tem sido empregado somente em estudos acadêmicos (Schallig *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006).

Alguns estudos brasileiros têm avaliado a utilização dos testes imunológicos, para a detecção de anticorpos anti-rK9, sobretudo em áreas de alta endemicidade (Badaró *et al.*, 1996a; Braz *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2006). A possibilidade de estudar a prevalência de infecção assintomática por *L. chagasi* numa área de autoctonia recente e baixa endemicidade, como o município de Araçatuba, motivou a realização deste estudo. O dimensionamento real da prevalência da infecção por *L. chagasi* pode contribuir para a definição e avaliação do impacto das medidas de controle.

2- OBJETIVOS

- Determinar a prevalência da infecção assintomática por *Leishmania chagasi* em área de autoctonia recente, município de Araçatuba.
- Avaliar os fatores de risco associados aos casos de indivíduos infectados assintomáticos nas áreas selecionadas nesse município.

3- SUJEITOS E MÉTODOS

3.1- Desenho do Estudo

Estudo transversal, com amostragem aleatória de fase única.

3.2- Período de Estudo

O estudo foi realizado no decorrer do período de fevereiro de 2003 a dezembro de 2006, sendo que a coleta de amostras foi realizada entre outubro e dezembro de 2004.

3.3- Local

O município de Araçatuba (figura 1), localizado no Planalto Ocidental Paulista, região Noroeste do estado de São Paulo, a 21°12'12,30" de latitude sul e 50°26'17,58" de longitude oeste, distante aproximadamente 530km da capital, 140km da divisa com o estado do Mato Grosso do Sul e 150km de Minas Gerais, por rodovia. Sua área total é de 1167km², com área urbana de 60,44km² e, 1106,5km² de área rural.

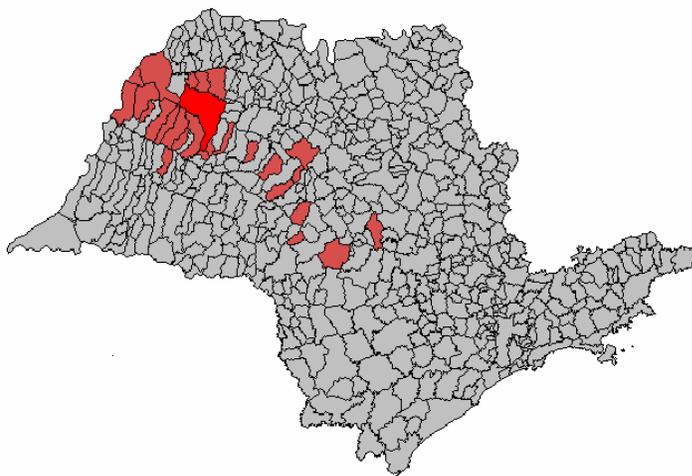


Figura 1- Mapa do estado de São Paulo dividido por municípios. A área mais escura representa o município de Araçatuba.

Além dos bairros, a cidade apresenta uma divisão em áreas e setores, que compreende 8 áreas subdivididas em 5 setores cada (figura 2), constituídos por um número de quarteirões que variam entre 83 a 154. Esta organização é determinada por características utilizadas para o cálculo do IPTU (Imposto Predial e Territorial Urbano) pela prefeitura. Para delimitar este perfil são consideradas diferentes variáveis: localização, área do terreno, área construída, tipo de acabamento do imóvel, renda média familiar, entre outras.

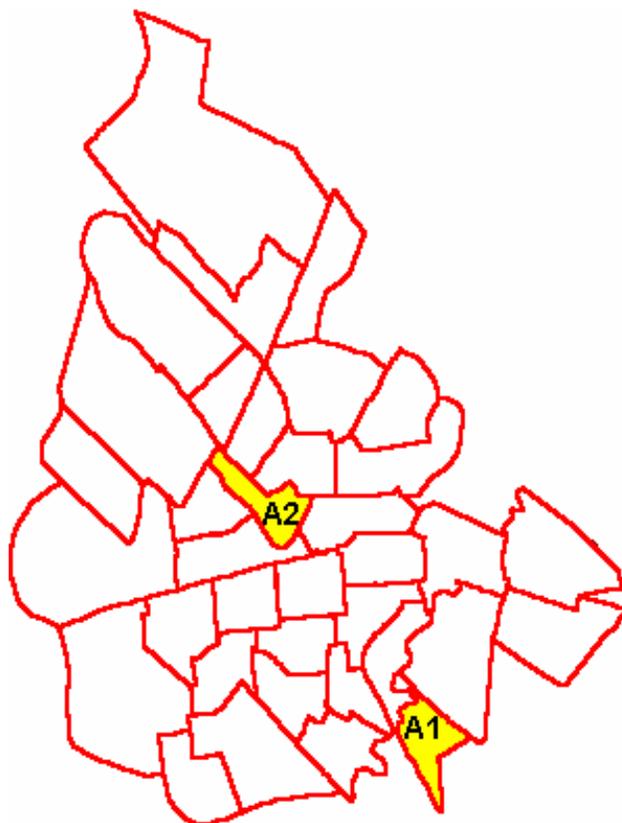


Figura 2- Mapa esquematizado da área urbana de Araçatuba com parte da divisão em áreas e setores. As regiões em amarelo representam as áreas 1 e 2 estudadas.

Assim sendo, foram escolhidas 2 (duas) áreas com características bastante distintas, descritas a seguir.

A primeira, designada área 1 (A1), correspondente à área 5 setor 5 (A5s5), da divisão setorial do IPTU. Esta área é constituída por 88 quarteirões, localizada na periferia do município, com renda familiar baixa, equivalente às classes sociais D e E, terrenos pequenos com no máximo 250m², imóveis de pequena dimensão, acabamento simples ou muitas vezes ausente, apresentando frequentemente duas ou mais residências no mesmo terreno (Figura 3). Nesta área a transmissão é recente e intensa, conforme verificação das notificações (tabela 1).



Figura 3- Fotografia de uma casa característica da área 1 (A5s5).

A segunda área, denominada área 2 (A2), correspondente à área 3, setor 5 (A3s5), segundo a divisão municipal do IPTU. Apresenta 88 quarteirões, localizada no centro da cidade, com renda familiar correspondente às classes B e C. Os terrenos apresentam dimensões superiores à 250m², destinados a uma única residência e os imóveis variam de médio a grandes com bom acabamento (Figura 4). Nesta região foi notificado o primeiro caso de leishmaniose visceral do município, em 1998. Atualmente há poucos casos notificados (tabela 1).



Figura 4- Fotografia de uma casa característica da área 2 (A3s).

Tabela 1- Notificações de LVA em Araçatuba, de 1999 a 2004, segundo a área e setor.

Área	Setor	1999	2000	2001	2002	2003	2004	Total
1	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	1	0	1	4	1	0	7
	3	1	0	2	3	3	1	10
	4	1	0	1	3	0	0	5
	5	2	0	1	1	3	1	8
2	1	1	0	0	1	1	1	4
	2	0	0	0	1	2	0	3
	3	0	0	0	1	2	0	3
	4	1	0	1	8	1	0	11
	5	0	0	0	1	2	2	5
3*	1	0	1	2	4	2	3	12
	2	0	1	1	3	1	0	6
	3	0	0	0	0	1	0	1
	4	2	2	1	0	0	1	6
4	5*	2	0	1	0	0	0	3
	1	0	0	3	0	1	1	5
	2	0	1	0	1	0	0	2
	3	0	0	1	0	0	0	1
	4	0	0	0	1	0	0	1
5#	5	0	0	0	1	0	0	1
	1	0	1	1	0	0	0	2
	2	1	1	2	1	0	1	6
	3	0	0	1	4	0	0	5
	4	1	0	2	1	4	0	8
6	5#	0	0	6	6	5	0	17
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	1	0	0	1
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	1	0	1	0	2
7	5	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	1	0	0	1
	3	1	0	0	0	4	0	5
	4	0	0	0	0	2	0	2
8	5	0	0	0	1	3	0	4
	1	1	0	1	1	1	1	5
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
Total	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	15	7	29	49	40	12	152

* Área 3, setor 5, correspondente a A2 do presente estudo;

Área 5, setor 5, correspondente a A1 do estudo.

3.4- População

Segundo o censo do ano de 2000 (IBGE), a cidade apresenta aproximadamente 170 mil habitantes.

Para selecionar os indivíduos nas referidas regiões da cidade sortearam-se os números das quadras. A coleta iniciava pelo imóvel número 1 e em seqüência para os demais números ímpares, até o final dos terrenos da quadra. Em caso de ausência ou recusa dos moradores a equipe passava para o casa imediatamente ao lado.

3.4.1- Critérios de Seleção

3.4.1.1- Critérios de Inclusão

Indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a dois anos, habitantes de Araçatuba há no mínimo dois anos, sem relato de febre nos últimos seis meses e sem suspeita médica ou tratamento anterior para leishmaniose visceral, que aceitaram a participação na pesquisa.

3.4.1.2- Critérios de Exclusão

Crianças abaixo de dois anos ou maiores habitantes temporários (visitantes, viajantes ou turistas). Também, indivíduos com queixa de febre nos últimos seis meses sem diagnóstico definido.

3.5- Métodos

3.5.1- Análise Estatística

Os testes foram realizados utilizando amostragem aleatória estratificada de fase única. Para o cálculo do tamanho da amostra utilizou-se a fórmula: $n = [(p*q)/\alpha^2]$.

Devido falta de conhecimento preciso a respeito da prevalência da leishmaniose visceral no município considerou-se:

_ o erro aceitável (tipo 1 = alfa) seria de 5% ($\alpha = 0,05$)

_ “p” (número de casos assintomáticos) = 0,5

_ $p = (q-1)$

O valor encontrado de “n” foi igual a 100 amostras por área.

Após a coleta das informações, os resultados foram tabulados em planilha de dados Excel. Para a análise dos dados utilizou-se o programa estatístico “Stata” e EpiInfo versão 6.04b (Dean *et al.*, 1994).

As variáveis categóricas foram analisadas segundo Teste χ^2 (qui quadrado) ou Teste Exato de Fisher Bicaudal, quando apropriado.

Foi considerado o valor de “p” de 0,05 como significância estatística.

3.5.2- Instrumentos e Forma de Coleta

O processo inicial caracterizou-se pelo levantamento das áreas delimitadas para esta pesquisa. Uma vez selecionadas as 2 áreas desejadas, realizou-se o levantamento preliminar de dados (Anexo 1). Nesse formulário constam as seguintes informações básicas: número do quarteirão, nome da rua, número do terreno (determinado por metodologia já existente), tipo do imóvel (residencial, comercial, templos, terrenos baldios).

Na segunda fase, duas equipes colheram as amostras de sangue diariamente, de segunda a sexta-feira, das 8 às 13 horas. Cada grupo contava com dois profissionais que identificavam as residências, seus moradores e preenchiam os questionários (Apêndice 1), e também verificavam os critérios para inclusão ou exclusão. Em seguida, uma enfermeira e uma auxiliar coletavam o sangue de forma asséptica com auxílio de seringa, à vácuo,

descartável de 5ml, sem anti-coagulante. Após a devida identificação das amostras, o material era acondicionado em caixas de isopor com gelo.

Ao final de cada expediente, as equipes retornavam à SUCEN – Araçatuba, onde o material era armazenado em geladeira até o momento da realização dos testes, sempre no período da tarde, no mesmo dia da coleta.

3.5.3- Método Laboratorial

Realização do teste imunocromatográfico para a detecção de anticorpos anti-rK39

Segundo as instruções do fabricante do “kit” Kalazar Inbios[®], as amostras de sangue foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos para separação do soro, que foi aliquotado em frascos tipo “eppendorf”. Placas de 96 poços, com fundo chato (placas de ELISA), receberam 50µl de cada amostra de soro (figura 5), em seguida acrescentou-se 50µl do reagente (figura 6) e incubou-se por 3 minutos, finalmente as tiras de nitrocelulose, impregnadas com antígenos recombinante K39, foram mergulhadas nos referidos poços (figura 7) e incubadas por mais 10 minutos. Após este período, foi realizada a leitura dos resultados, sendo considerados positivos os que apresentaram duas bandas coradas (figura 8). A leitura foi realizada por duas pessoas separadamente e, foram considerados positivos quando houve consenso na avaliação.



Figura 5



Figura 6

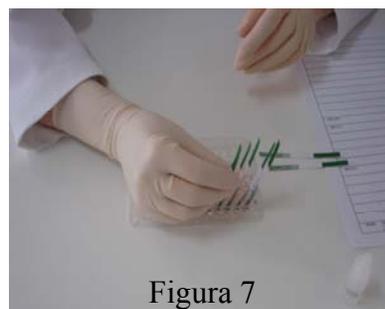


Figura 7

Figuras 5, 6 e 7- Sequência do processamento do teste rápido com antígeno rK39.



Figura 8- “Dipsticks” do teste rápido com rK39. O resultado positivo (fita superior) apresenta duas bandas de cor avermelhada; enquanto o resultado negativo (fita inferior) mostra apenas uma banda controle (lado esquerdo).

3.5.4- Variáveis de Interesse

- _ Área
- _ Gênero
- _ Idade
- _ Presença de cães
- _ Antecedentes de cães nos 2 últimos anos
- _ Cães eutanasiados devido a LV
- _ Características dos Imóveis
- _ Área do terreno
- _ Tipo: presença de grama, piso impermeável, solo descoberto, árvores, entulhos
- _ Presença de outros animais

Para avaliar a proporção de indivíduos infectados assintomáticos nas áreas avaliadas em relação aos casos humanos de leishmaniose visceral, foram utilizados os dados de notificação de casos humanos de LV de Araçatuba, segundo a área de estudo (SUCEN, comunicação pessoal) no período de 1998 a 2004.

3.5.5- Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas sendo aprovado sem restrições.

Os sujeitos da pesquisa foram informados acerca da finalidade do presente trabalho e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 2).

Para indivíduos menores de 18 anos foi obrigatória a autorização do responsável legal (pais ou responsável). Os dados referentes à identificação dos voluntários foram mantidos em sigilo.

4- RESULTADOS

4.1- Descrição das Áreas e População

Segundo levantamento, a estimativa de habitantes nas áreas estudadas é de 6614 em A1 e 5836 em A2. Assim, o número de casos notificados para cada mil habitantes é de 2,57 em A1 e 0,51 em A2.

Foram visitadas 47 residências em A1 e 50 em A2, com uma média de 5,32 e 5,0 moradores por habitação em A1 e A2 respectivamente, totalizando 250 indivíduos, sendo 125 de cada área. Houve apenas duas recusas em participar da pesquisa, uma em cada área. Contudo, nas residências visitadas, todos os habitantes presentes aceitaram a participação.

As características demográficas das populações estudadas são apresentadas nas tabelas 2 e 3, para as áreas 1 e 2 respectivamente.

Entre os moradores pesquisados, a média de tempo de residência no município é, aproximadamente, 26 anos, a mediana 23,5 anos, com um tempo máximo de domicílio de 76 e nunca inferior a 2 anos (tabela 4). Em A1, a idade média é de 30,6 anos, com uma mediana igual a 28 e idade máxima de 83 anos. Enquanto em A2 a média obtida foi de, aproximadamente, 44 anos e mediana 45, sendo a idade máxima 83 anos.

Tabela 2- Distribuição dados demográficos da população humana em A1.

Faixa etária	A1					
	Feminino		Masculino		Total	
	n	%	n	%	n	%
02 a 13	16	12,8	12	9,6	28	22,4
14 a 19	14	11,2	07	5,6	21	16,5
20 a 39	26	20,8	14	11,2	40	32,0
40 a 59	13	10,4	09	7,2	22	17,6
60/mais	07	5,6	07	5,6	14	11,2
Total	76	60,8	49	39,2	125	100

Tabela 3- Distribuição dos dados demográficos da população humana em A2.

Faixa etária	A2					
	Feminino		Masculino		Total	
	n	%	n	%	n	%
02 a 13	08	6,4	08	6,4	16	12,8
14 a 19	06	4,8	01	0,8	07	5,6
20 a 39	18	14,4	12	9,6	30	24,0
40 a 59	20	16,0	11	8,8	31	24,8
60/mais	24	19,2	17	13,6	41	32,8
Total	76	60,8	49	39,2	125	100

Tabela 4- Tempo médio de residência dos habitantes testados nas áreas 1 e 2.

	A1	A2
Média	20,5	32
Mediana	17	34,5
Mínimo	02	02
Máximo	66	76

As morbidades de maior interesse e/ou condições associadas de maior relevância encontradas nas duas áreas estão listadas na tabela 5.

Tabela 5- Distribuição das morbidades/condições associadas de acordo com a área avaliada.

	Área 1*		Área 2*		Total*	
	n	%	n	%	n	%
Diabetes	2	1,6	6	4,8	8	3,2
HIV	0	-	1	0,8	1	0,4
Doença de Chagas	2	1,6	0	-	2	0,8
Cardiopatia/Nefropatia	2	1,6	4	3,2	6	2,4
Linfoma	0	-	1	0,8	1	0,4
Hepatites	3	2,4	4	3,2	7	2,8
Gestação	1	0,8	2	1,6	3	1,2
Imunossupressor	-	-	1	0,8	1	0,8
Corticóides	1	0,8	5	4,0	6	2,4

* Amostra de cada área n = 125. Amostra Total n = 250.

4.2- População canina

Com relação aos cães, as referidas áreas mostraram números semelhantes de animais. Na área 1 foram encontrados 32 cães, em 22 residências; enquanto na área 2 foram, 38 cães em 23 domicílios visitados. Contudo, o número destes animais nos últimos 2 anos foi diferente. Na área 1 dezoito moradores afirmaram ter possuído 35 cães, dos quais 11 foram eutanasiados devido a LV em 11 diferentes domicílios; enquanto a área 2 apresentou 12 residências com 13 cães, sendo 06 eutanasiados devido a LV, em 06 residências (tabela 6).

Tabela 6- Descrição da dinâmica da população canina nas áreas avaliadas nos últimos 2 anos.

	Área 1		Área 2		Total
	n	%	n	%	n
Total de residências	47	48,45	50	51,55	97
Residências com cães	22	48,89	23	51,11	45
No. total de cães	32	45,71	38	54,28	70
Residências com cães (2anos)	18	60	12	40	30
No. de cães últimos 2 anos	35	72,92	13	27,08	48
Letalidade canina por LVC	11	64,71	06	35,29	17

Os imóveis visitados mostraram diferentes características quanto às áreas externas e a presença de outros animais de estimação além dos cães. O aspecto do terreno e a forma de utilização do solo foram analisadas para posterior relacionamento com a presença do vetor (tabela 7).

Tabela 7- Características das áreas externas dos imóveis em A1 e A2.

Características*	Área 1		Área 2	
	n (47)	%	n (50)	%
Terreno maior que 200m ²	09	19,15	46	92
Gramado	05	10,64	02	4
Árvore(s)	23	48,94	17	34
Mato	10	21,28	06	12
Horta	08	30,04	03	6
Impermeabilizado	20	42,55	46	92
Entulho	17	36,17	01	2
Outros	09	19,14	02	4

* As características podem ser únicas ou combinadas com 2 ou mais destas em cada imóvel (gramado + entulho ou árvore + horta + mato p.ex.).

Além dos cães, foi observada e questionada a presença de outros animais de estimação ou de cultura de subsistência (tabela 8).

Tabela 8- Distribuição dos outros animais, domésticos de estimação ou para consumo, segundo a área.

Animais	Área 1		Área 2	
	n (32)	%	n (24)	%
Galinhas	4	12,5	1	4,17
Coelhos	-	-	1	4,17
Hamster	2	6,25	-	-
Gato	16	50	8	33,33
Tartarugas	1	3,125	-	-
Outras Aves	8	25	14	58,33
Porco	1	3,125	-	-

Em relação ao conhecimento do vetor, diferenciação entre flebotomíneos e culicídeos, e a captura nas residências: na área 1, 22 pessoas afirmaram conhecer o vetor, contudo, destas, apenas 4 afirmaram ter ocorrido a captura em sua casa. E, na área 2, 29 moradores disseram conhecer e desses 23 afirmaram ter ocorrido captura do vetor em seus domicílios.

4.3- Resultados dos testes sorológicos com o antígeno rK39

Foram encontrados 23(18,4%) casos positivos em A1 (Tabela 9) e 06(4,8%) casos em A2 (Tabela 10). Fornecendo 3,48 resultados por mil habitantes em A1 e 1,03 em A2. Verificou-se uma diferença significativa entre as duas áreas ($p = 0,0016$ O.R. 4,47 I.C. $1,64 \leq OR \leq 12,80$). E as proporções entre os casos notificados e indivíduos assintomáticos foram respectivamente 1:1,35 na área 1 e 1:2 na área 2.

Não houve relação estatisticamente significativa entre os resultados nas faixas etárias.

Tabela 9- Distribuição dos resultados dos testes utilizando o antígeno recombinante K39 na A1, de acordo com a faixa etária e sexo.

A1								
Feminino (76)					Masculinos (49)			
Faixa etária	Positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
	n	%	n	%	n	%	n	%
02 a 13	1	1,32	15	19,74	1	2,04	11	22,45
14 a 19	1	1,32	13	17,11	3	6,12	4	8,16
20 a 39	6	7,89	20	26,32	2	4,08	12	24,49
40 a 59	3	3,95	10	13,16	1	2,04	8	16,33
60/mais	3	3,95	4	5,26	2	4,08	5	10,20
Total	14	18,42	62	81,58	9	18,37	40	81,63

Tabela 10- Distribuição dos resultados dos testes utilizando o antígeno recombinante K39 em A2, de acordo com a faixa etária e sexo.

Faixa etária	A2							
	Feminino (76)				Masculino (49)			
	Positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
n	%	n	%	n	%	n	%	
02 a 13	1	1,32	7	9,21	-	-	8	16,33
14 a 19	-	-	6	7,89	-	-	1	2,04
20 a 39	-	-	18	23,68	1	2,04	11	22,45
40 a 59	1	1,32	19	25,00	-	-	11	22,45
60/mais	1	1,32	23	30,26	2	4,08	15	30,61
Total	3	3,95	73	96,05	3	6,12	46	93,88

Ao agrupar as diferentes faixas etárias em: crianças de 02 à 13 anos com jovens de 14 à 19 anos, e adultos com demais faixas etárias, também não foi encontrado relação estatisticamente significativa entre os resultados positivos ($p=0,7101$ O.R. $0,76$ I.C. $0,28 \leq OR \leq 2,00$). O mesmo ocorreu em relação com a análise de sexo das duas áreas ($p = 0,00$ O.R. $1,11$ I.C. $0,47 \leq OR \leq 2,59$).

Confrontando as morbidades/condições associadas aos resultados positivos com o antígeno rK39 obtidos (tabela 11) não foi verificada relação significativa em quaisquer das áreas ($p = 0,5469$ O.R. $1,10$ $0,24 \leq OR \leq 4,47$).

Tabela 11- Resultados positivos relacionados com as morbidades e condições associadas encontradas nas duas áreas.

Morbidades	Área 1					Área 2					p	OR
	Condições Associadas	(+)	%	(-)	%	Total	(+)	%	(-)	%		
Diabetes	-	-	2	15,38	2	1	4,34	5	21,74	6	0,75	-
HIV	-	-	-	-	-	-	-	1	4,34	1	0,50	-
D.Chagas	1	7,69	1	7,69	2	-	-	-	-	-	-	-
Cardiopatía/Nefropatia	1	7,69	1	7,69	2	1	4,34	3	13,04	4	0,60	-
Linfoma	-	-	-	-	-	-	-	1	4,34	1	-	-
Hepatites	1	7,69	2	15,38	3	1	4,34	3	13,04	4	0,78	0
Gestação	-	-	1	7,69	1	-	-	2	8,69	2	-	-
Imunossupressor	-	-	-	-	-	-	-	1	4,34	1	-	-
Corticóides	-	-	1	7,69	1	-	-	5	21,74	4	-	-
Total	3	23,08	8	76,92	11	3	13,04	21	91,27	24		

Os resultados positivos encontrados não mostraram relação com a presença de cães nas residências (tabela 12). Contudo, quando esses resultados são confrontados individualmente com a presença canina, esta alcança significância estatística (tabela 14).

O mesmo perfil ocorreu quando foi observada a presença destes animais ao longo dos 2 últimos anos. Quando confrontados com resultados positivos individualmente houve significância ($p < 0,0001$ O.R. $4,86 \leq OR \leq 11,67$) (tabelas 15), contudo, os casos agrupados por residência, quando comparados, não apresentou significância estatística ($p = 0,2088$ O.R. $2,18 \leq OR \leq 6,74$) (tabelas 13).

Finalmente, outras variáveis de interesse avaliadas mostraram resultados estatisticamente significativos como a dimensão do terreno ($p = 0,0031$ O.R. $0,18 \leq OR \leq 0,61$) e a presença de impermeabilização do solo ($p = 0,0089$ O.R. $0,23 \leq OR \leq 0,73$). Entretanto, a presença de entulho, horta e solo descoberto não apresentaram resultados significativos.

Tabela 12- Relação dos resultados do teste rK39 de acordo com a presença e letalidade canina por domicílio na A1 (n=47).

	Resultados dos testes com rK39						
	(+)	(%)	(-)	(%)	OR	95% IC	p
No. de residências com cães	06	12,76	16	34,04	0,67	0,16 – 2,73	0,7437
Antecedentes de cães últimos 2 anos	08	17,02	10	21,28	2,51	0,60 – 10,77	0,2585
Letalidade canina por LVC	01	2,13	10	21,28	0,16	0,01 – 1,46	0,0629

Tabela 13- Relação dos resultados do teste rK39 de acordo com a presença e letalidade canina por domicílio na A2 (n=50).

	Resultados dos testes com rK39						
	(+)	(%)	(-)	(%)	OR	95% IC	p
No. de residências com cães	02	4	21	42	0,76	0,08 – 6,45	0,5779
Antecedentes de cães últimos 2 anos	01	2	11	22	0,77	0,00 – 9,00	0,6549
Letalidade canina por LVC	00	0	06	12	0,00	0,00 – 10,24	0,5126

Tabela 14- Relação dos resultados do teste rK39 de acordo com a presença e letalidade canina entre os moradores da área 1 (n=125).

	Resultados dos testes com rK39						
	(+)	(%)	(-)	(%)	OR	95% IC	p
Presença de cães	05	4,0	57	45,6	0,22	0,07 – 0,69	0,0064
Antecedentes de cães últimos 2 anos	16	12,8	32	25,6	5,00	1,71 – 15,04	0,0016
Letalidade canina por LVC	02	1,6	33	26,4	0,20	0,03 – 0,96	0,0428

Tabela 15- Relação dos resultados do teste rK39 de acordo com a presença e letalidade canina entre os moradores da área 2 (n=125).

	Resultados dos testes com rK39						
	(+)	(%)	(-)	(%)	OR	95% IC	p
Presença de cães	02	1,6	64	51,2	0,43	0,05 – 2,88	0,2882
Antecedentes de cães últimos 2 anos	01	0,8	18	14,4	1,12	-	0,6363
Letalidade canina por LVC	00	00	12	9,6	0,00	0,00 – 9,69	0,5386

Tabela 16- Relação entre os resultados do teste com Ag-rK39 e variáveis de interesse e categorização.

Característica		rK39(+)	rK39(-)	OR (IC95%)	p
Área	1	23	102	4,47	0,0016
	2	6	119		
Sexo	Masculino	12	86	0,76	0,7101
	Feminino	17	135		
Faixa Etária	02-19	07	65	1,11	0,9574
	20-acima	22	156		
Condições Imunossupressoras	Presente	1	19	0,00	0,3674
	Ausente	28	202		
Presença atual de Cães no Domicílio (casos)	Presença	07	121	0,26	0,0037
	Ausência	22	100		
Presença atual de Cães no Domicílio (residência)*	Presença	08	37	0,72	0,6953
	Ausência	12	40		
Antecedente de cães no domicílio (casos)	Presença	17	50	4,85	< 0,001
	Ausência	12	171		
Antecedentes de cães com LV (casos)	Presente	02	45	0,29	0,1356
	Ausente	27	176		
Horta	Presente	03	08	1,52	0,4041
	Ausente	17	69		
Entulho	Presente	06	11	2,81	0,0769
	Ausente	13	67		
Dimensão dos terrenos	Menor 200m ²	15	27	5,56	0,003
	Maior 200m ²	05	50		
Impermeabilização do solo	Presente	08	57	0,23	0,0089
	Ausente	12	20		

* N° total de residências = 97

5- DISCUSSÃO

5.1- Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi*

Foram observadas prevalências de infecção por *L chagasi* distintas nas áreas avaliadas, 18,4% na A1 e 4,8% na A2. Nesta área, apesar de ter sido relatada transmissão autóctone mais antiga (1998), o número de casos humanos de LV ativa tem apresentado redução a cada ano, enquanto na A1, embora os registros tenham sido mais recentes, a doença ativa encontra-se em expansão. É possível que a diferença de prevalência entre as áreas, tenha relação direta com o perfil sócio-econômico. Esta associação entre o gradiente de distribuição, de acordo com o nível sócio-econômico, foi verificada para outras doenças transmitidas por vetores, como dengue, no Texas (Reiter *et al.*, 2003).

A cidade de Natal (RN) também apresentou aumento de casos no final da década de 1980 e, Jerônimo e colaboradores (1994) analisaram a situação uma vez que a incidência da LV cresceu significativamente no ambiente urbano, como em Araçatuba. Foram avaliados 210 parentes e vizinhos próximos de casos de doença ativa e encontraram prevalência de 38% de infecção, através do teste intradérmico.

Na Bahia, Cunha e colaboradores (1995) investigaram a Vila de Monte Gordo, área de transmissão recente, onde encontraram prevalência de 30% com teste cutâneo e 14% com ELISA. Esta elevada prevalência assemelha-se a observada em áreas de transmissão antiga, embora não tenha sido verificada relação com faixa etária inferior a cinco anos, quadro semelhante ao encontrado em Araçatuba.

Finalmente, Moreno e colaboradores (2006) diagnosticaram 2,4% a 5,6% de prevalência entre 1604 indivíduos assintomáticos em Sabará (MG), na região metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), considerada como de baixa prevalência (2006). Neste estudo foram comparados diferentes métodos sorológicos: RIFI, ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste imunocromatográfico com Ag-rK39, além de hibridização com sonda específica para espécies do complexo *Donovani*. Os resultados de sensibilidade e especificidade foram muito discordantes e inferiores aos valores encontrados na literatura.

5.2- Proporção entre infecção e casos de leishmaniose visceral

Embora os estudos de prevalência de infecção humana assintomática, por *L. chagasi*, não demonstrem uma relação bem definida e uniforme entre a proporção dos casos de doença ativa e de indivíduos infectados, trata-se de um instrumento auxiliar para o real dimensionamento da doença e adoção das medidas de controle. Araçatuba apresenta, em média, 0,89 casos notificados para cada 1000 habitantes, contudo, nas duas áreas avaliadas, os valores foram superiores, sendo 3,48/1000 em A1 e 1,03/1000 em A2, proporcionando um coeficiente de 0,74 entre os casos notificados e os resultados positivos com o teste rK39 em A1 e 0,5 em A2.

Diferentes proporções de casos ativos/indivíduos assintomáticos têm sido observadas de acordo com a região avaliada, a faixa etária, perfil socioeconômico e intervenções realizadas. O desencadeamento das medidas de controle a partir dos casos notificados de LV ativa em Araçatuba, provavelmente interferiu nos resultados obtidos. Em função destas medidas, eliminação de cães infectados e pulverização de inseticida na área próxima ao foco (Vieira *et al.*, 1990; Lacerda, 1994) ocorreu um impacto no número de casos da doença. A precocidade na detecção da infecção canina e a efetividade das medidas relacionam-se de forma inversa à disseminação da infecção e à ocorrência de LV ativa (Braga *et al.*, 1998).

Badaró e colaboradores acompanharam crianças, abaixo de 15 anos, em Jacobina (BA), encontrando diferentes proporções, que variaram ano a ano e, por setores da cidade: de 1,3 a 5,5 casos assintomáticos/1000 para cerca de 4,3 casos ativos de LV/1000 habitantes. No setor mais afetado da cidade, foi reportada uma proporção de 6,5 crianças infectadas, por *L. chagasi*, para cada criança diagnosticada (1986b, 1986c).

No distrito de Brotas (CE), Evans e colaboradores acompanharam crianças abaixo de 11 anos, entre 1987 e 1989, onde encontraram uma taxa de soroconversão de 4,6%, com uma incidência de 5,5 casos/1000 crianças (1992).

Em Teresina, Piauí, Costa e colaboradores avaliaram dados notificados entre os anos de 1980 a 1986, e concluíram que o número de infecções assintomáticas ou oligossintomáticas foi superior a 18,5 infectados para cada doente, índice encontrado na

Bahia, por Badaró em 1986 (Costa *et al.*, 1990). A falta de relação entre as notificações de casos humanos e a presença de cães nas residências ou próximo a elas (1999), somada à dificuldade de diminuição dos casos de LV humana em Teresina, levaram essa equipe acreditar na possibilidade de haver a infecção de *Lutzomyia longipalpis* após a picada em seres humanos. Assim, após experimentos com grupos de indivíduos diagnosticados que ainda não haviam recebido tratamento e outros assintomáticos, estes pesquisadores demonstraram que o primeiro grupo de indivíduos é capaz de infectar o vetor, enquanto o segundo grupo não, justificando que a pequena quantidade de sangue que o díptero sugou durante o repasto não foi suficiente para completar o ciclo de transmissão da parasitose entre os assintomáticos (2000). Ainda perseguindo esta hipótese, Costa e sua equipe testaram novamente a capacidade de assintomáticos fecharem o ciclo de transmissão, sem uma conclusão definitiva (2002).

5.3- Fatores associados à infecção por *Leishmania chagasi*

Os fatores associados à maior prevalência de indivíduos com infecção assintomática no presente estudo foram: a área, a presença de cães nos últimos 2 anos. Outras variáveis como a dimensão dos terrenos e a impermeabilização do solo também demonstraram significância estatística mas, provavelmente, estão relacionados à condição sócio-econômica das duas áreas.

Araçatuba possui um IDH de 0,85, devido às boas condições sanitárias em toda a cidade, com fornecimento de água potável, coleta de lixo freqüente e rede de esgoto (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2000) e apesar destas características a LV foi introduzida e disseminou-se no município, contrapondo-se ao afirmado por Wijeyaratne e col (1994) com relação ao nível de condições humanas nas áreas afetadas pela LV. O cenário epidemiológico clássico de municípios acometidos pela LV, pode ser exemplificado por municípios do interior nordestino, como Jacobina (CE) e Brotas (CE), que apresentam um IDH que não ultrapassa 0,66. Apesar do IDH observado no município, existe uma heterogeneidade nas áreas avaliadas em Araçatuba.

Com relação às faixas etárias, no presente estudo, em Araçatuba, não houve a predominância em crianças, contrapondo-se ao observado por outros autores em cenários de alta endemicidade (Costa *et al*, 2002) e transmissão antiga do parasita, como relatado por Badaró e col (1986b) em Jacobina (BA), ou por Evans e col (Evans, 1992) em Brotas (CE). A maior taxa de infecção ocorreu em adultos jovens, assim como verificado por Cunha e colaboradores em Monte Gordo (BA), que também é uma área de transmissão recente (1995).

A média de cães por domicílio foi de 1,45 e 1,65 em A1 e A2 respectivamente. Esses animais estão presentes nas residências ainda em maior quantidade nos últimos 2 anos, sendo que em A1 a média de cães por residência foi de 1,94, mas em A2 foi de apenas 1,08. Assim, percebeu-se que a presença atual desses animais de estimação tem relação com os casos diagnosticados por rK39 em A1, porém isto não ocorreu em A2. A presença canina nos dois anos anteriores também mostra esta relação estatisticamente significativa. Assim, é possível verificar que os resultados demonstram a interferência da eliminação dos cães, como medida de controle nas áreas, em períodos diferentes de detecção de autoctonia.

5.4-Utilidade do teste imunocromatográfico com antígeno rK39

Ainda há divergências, entre os pesquisadores, a respeito da escolha de um dos testes sorológicos em investigações epidemiológicas. Veeken e colaboradores (2003) afirma que, apesar da alta sensibilidade, a utilização do rK39 é restrita a áreas de alta prevalência, devido aos resultados falso-positivos encontrados em comparação com aspirados de medula.

Enquanto Chappuis (2003) declara que seus resultados foram excelentes no Nepal. Mais recentemente, Toz e colaboradores testaram rK39 na Turquia, com 100% de sensibilidade e especificidade contra 87% do RIFI. Toz também questiona a diferença entre a resposta obtida por outros pesquisadores em populações da África e da Ásia (Toz *et al*, 2004). Boelaert e colaboradores compararam rK39, DAT e exame

parasitológico. Este grupo de pesquisadores validou seus resultados estatisticamente e concluiu que tanto o rK39 quanto o DAT, apresentaram alta sensibilidade, mas, a especificidade foi considerada apenas moderada. Contudo, conclui afirmando que o teste com “dipsticks” de rK39 pode ser utilizado pelo serviço de saúde, dependendo da análise de outras características como a prevalência e o custo (Boelaert *et al.*, 2004).

Com relação à especificidade, estudiosos afirmam que a escolha do grupo controle interfere neste resultado (Boelaert *et al.*, 2004; Toz *et al.*, 2004; Veecken *et al.*, 2003; Chappuis *et al.*, 2003; Schallig *et al.*, 2002).

Finalmente, em estudo publicado por Chappuis e colaboradores, realizando uma meta-análise em publicações que testaram rK39 e DAT concluiu que os resultados dos diagnósticos ficaram entre bom e excelente, em populações sem co-infecção com HIV. O desempenho dos dois métodos são comparáveis, entretanto o rK39 é mais barato e mais fácil de ser utilizado, resultado que confirma a afirmação de Bern sobre os custos per capita, de cada tipo de exame sorológico, US\$ 1,20 para o rK39 e US\$ 8,00 para o DAT (Bern *et al.*, 2000; Chappuis *et al.*, 2006).

Atualmente, já existe outro fabricante deste tipo de teste rápido, o IT-Leish® (DiaMed-Switzerland), testado por Sundar e colaboradores, em 2006. Foram comparados os dois testes rápidos existentes que utilizam “dipsticks” impregnados com rK39, Kalazar Detect® (InBios-USA) e IT-Leish® (DiaMed-Switzerland). O segundo é ainda mais fácil de executar uma vez que utiliza o sangue total do paciente, sem necessidade de centrifugação das amostras (Sundar *et al.*, 2006a).

No Brasil, os testes sorológicos com Ag-rK39 foram realizados por diferentes grupos de pesquisa. Schallig e colaboradores testaram amostras de soro provenientes de diferentes cidades brasileiras (Belo Horizonte, Recife, Manaus) e, diferentes países (Uganda, Holanda, Kenya e Indonésia). Estes pesquisadores concordam com a diferença de desempenho do “dipstick” impregnado com Ag-rK39 (Schallig *et al.*, 2002). Entretanto, Carvalho e colaboradores, testando amostras de pacientes de Minas Gerais e Espírito Santo obtiveram 98% de sensibilidade (Carvalho *et al.*, 2003). Enquanto Braz e colaboradores, no Rio Grande do Norte, observaram 94,7% de sensibilidade (Braz *et al.*, 2002). Resultados

semelhantes são descritos com a utilização do Ag-rK39 no ELISA. Moreno e colaboradores realizaram investigação epidemiológica, em Minas Gerais, comparando diferentes técnicas e obtiveram apenas 76% de sensibilidade (Moreno *et al.*, 2006; Braz *et al.*, 2002).

Apesar das divergências entre pesquisadores o teste rápido utilizando “dipsticks” impregnados com Ag-rK39 já está padronizado e é comercializado. Esta técnica trouxe a possibilidade de um exame não invasivo, com sensibilidade e especificidade satisfatórias, de fácil execução e leitura, sem necessidade de equipamentos especiais ou profissionais altamente qualificados e baixo custo, permitindo sua aplicação nas áreas mais afetadas pela LV (Singh, 2006; Sundar *et al.*, 2006b). Estas características viabilizam inquéritos epidemiológicos em áreas de risco, permitindo avaliar a abrangência da infecção por *L. chagasi*.

O teste, fundamentado na reação antígeno-anticorpo para a proteína de membrana K39, enquadrou-se no perfil escolhido para o presente trabalho. Este método torna viável inquéritos epidemiológicos mais abrangentes em populações de grandes áreas endêmicas. Seu desempenho, em outros países a exemplo da Índia e Nepal também afetados pela LV, mostrou resultados animadores (Sundar *et al.*, 1998, 2002; Bern *et al.*, 2000; Chappuis *et al.*, 2003). A facilidade e rapidez na execução deste teste são outros fatores favoráveis (Sundar *et al.*, 2006b), pois não necessita de equipamentos sofisticados, tampouco pessoas altamente capacitadas para sua aplicação. E, além dessas vantagens, apresenta um baixo custo.

A falta de investigação direcionada ao diagnóstico precoce tem como conseqüência a subestimação da prevalência da LV humana (Ashford *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 2000). Logo, há falta de parâmetros comparativos para uma análise mais profunda dos resultados obtidos no município de Araçatuba/SP.

Também não foi realizado, neste trabalho, o levantamento da densidade populacional do vetor e a prevalência de LV canina nas áreas estudadas, a fim de relacioná-las com os resultados obtidos.

As informações obtidas sugerem que a infecção humana por *L. chagasi*, em Araçatuba, é mais freqüente que os dados clínicos podem inferir. Portanto, é necessário mais investimentos em pesquisas de campo sobre a soroprevalência, a fim de ampliar os dados e melhorar os programas de controle de LV nas regiões afetadas por esta protozoose.

6- CONCLUSÃO

Após o levantamento epidemiológico realizado nas duas áreas escolhidas, foi possível verificar que a prevalência de *L chagasi* nas áreas avaliadas no município de Araçatuba/SP foi de 18,4% em A1 e de 4,8% em A2.

Houve diferença significativa entre as duas áreas selecionadas, porém o mesmo não é observado entre os sexos, faixas etárias e a presença de condições imunossupressoras.

Não há relação entre os resultados positivos encontrados e a presença de cães no período de coleta de amostras. Mas, ao comparar a presença destes animais nos dois anos anteriores existe relação significativa, o que sugere que a eliminação dos cães soropositivos como medida de controle, além de surtir efeito na transmissão, interferiu nos resultados.

A dimensão dos terrenos e a impermeabilização do solo revelam uma relação expressiva com os resultados positivos, considerando, possivelmente, os fatores associados à situação sócio-econômica da população das áreas avaliadas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allain DS, Kagan IG . A direct agglutination test for leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1975, 24(2):232-236.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitol.* 2004, 57:1:88.

Ashford RW, Desjeux P, Raadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol Today* 1992, 8(3):104-5.

Ashford RW. The leishmaniasis as model zoonoses. *Ann Trop Med Parasitol* 1997, 91(7):693-71.

Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM *et al.* rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996a, 173:758-61.

Badaró R, Johnson Jr WD. The role of interferon- γ in the treatment of visceral leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 1993, 167(suppl 1):S13-7.

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

Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM *et al.* A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1996b, 154(4):639-49.

Badaró R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. 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 Trop Med Hyg* 1986a, 35(1):72-78.

Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997, 24:684-703.

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

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

Boelaert M, Criel B, Leeuwenburg J, Van Damme W, Le Ra D, Van der Stuyft P. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, 94:465-71.

Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D *et al.* A comparative study of the effectiveness of diagnostic test for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004, 70(1):72-7.

Braga MDM, Coêlho ICB, Pompeu MML, Evans G, MacAullife IT, Teixeira MJ *et al.* Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por meio de ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998, 31(5):419-24.

Braz RFS, Nascimento ET, Martins DRA, Wilson ME, Pearson RP, Reed SG, Jerônimo SMB. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002, 67(4):344-8.

Burns Jr JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:775-9.

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

Camargo-Neves VLC, Spinola R, Lage L. A leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo: situação epidemiológica em 2001-2002. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003, 36(SII):27-29.

Chappuis F, Rijal S, Singh R, Acharya P, Karki BMS, Das ML. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and K39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Trop Med Int Health* 2003, 8(3):277-85.

Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BJM* 2006, 333:723-7.

Choudhury S, Haque F, Al-Masum A, Harith A, Karim E. Positive response to sodium antimony gluconate administration in visceral leishmaniasis seropositive patients. *Am J Trop Med Hyg* 1991, 44(4):390-393.

Costa AIP, Casanova C, Rodas LAC, Galati EAB. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo. *Rev Saúde Publ* 1997, 31(6):632-3.

Costa CHN Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado o Piauí, Brasil, 1980-1986 1990. *Rev Saúde Publ* 24(5):361-72.

Costa CHN, Pereira HF, Pereira FCA, Tavares JP, Araújo MV, Gonçalves MJO. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil?. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999, 93:464.

Costa CHM, Gomes RBB, Silva MRB, Garcez LM, Ramos PKS, Santos RS *et al.* Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infec Dis* 2000; 182:997-1000.

Costa CHM, Stewart JM, Gomes RBB, Garcez LM, Ramos PKS, Bozza M *et al.* Asymptomatic human carries of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(4):334-7.

Cunha S, Freire M, Eulálio C, Cristóvão J, Netto E, Johnson Jr WD *et al.* Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med* 1995, 89:155-8.

Dean AG, Dean JA, Burton A, Diche RC. EpiInfo Version 6.04B Word processing database and statistic program for epidemiology an microcomputers USA, Incorporated Stone Mountain, Georgia, 1990.

Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A, Arias J. Value of a dipstick based on recombinant rK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 2001, 8:355-7.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunol Microbiol Infect Dis* 2004, 27:305-18.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto *et al.* Effect of elimination seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 1997, 25:1240-2.

Duxbury RE, Sadun EH. Flourescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1964; 13(4):525-529.

Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Souza AQ *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 1992; 166:1124-32.

Grimaldi Jr G , Tesh RB. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol R* 1993; 6(3):230-50.

Guerin PJ, Oliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet* 2002; 2:494-501.

Hailu A, Kraan CCM, Schoone GJ, Berhe N, Schalling HDFH, Kagle PA. Sero-epidemiological assessment and in an endemic locality using Fast Agglutination Screening Test (FAST). *Acta Tropica* 2002 83(2):93-101.

Harith AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S *et al.* A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80:583-587.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999, 354:1191-9.

Hommer M, Petters W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 1978; 72(3):213-218.

Ikeda-Garcia F, Lopes RS, Marques FJ, Félix de Lima VM, Morinishi CK, Bonello FL et al.. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. Vet Parasitol 2007, 143(3-4):254-59.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Sinopse Preliminar do Censo Demográfico 2000. Editora IBGE vol 7 p 1-41.

Jaffe CL, Zalis M. Use of purified parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. J Infect Dis 1988; 157(6):1212-1220.

Jeronimo SMB, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994 88:386-8.

Laboratório Fleury. Manual de Exames. Laboratório Fleury S/C Ltda Editora 1996, p 260.

Laboratório Fleury 2007 [acesso em 11 nov. 2007] Disponível em URL: <http://www.fleury.com.br/Clientes/SaudeDia/Doencas/pages/Leishmaniose.aspx>

Lacerda M. The Brazilian leishmaniasis control program. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994, 89(3):489-95.

Laison R. The american leishmaniasis: some observations on the ecology and epidemiology. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77(5):569-96.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987, 81:517.

Laison R, Shaw JJ. A brief of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. Ciência e Cultura 1992; 44(2/3):94-106.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitol 1999, 119(3):237-246.

Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today 2000, 16(5):188-189.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). 2007a [acesso em 10 nov. 2007] Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=22136

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). 2007b [acesso em 10 nov. 2007] Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=22141

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/planilhas_dnc_casos_e_obitos_todas2006.pdf

Modabber F. Leishmaniasis. In WHO - Tropical Disease Research. Geneva: WHO Offset Publication, 1993. p 77-87.

Mohammed EAER, Wright EP, Kager PA, Laarman JJ, Poundman W. ELISA using intact promastigotas for immunodiagnosis of kala-azar. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985, 79:344-350.

Moreno EC, Genaro O, Palatnik de Souza CB, Souza EP, Costa RT, Melo MN et al. Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* através de técnicas sorológicas em amostras humanas de General Carneiro, área urbana de Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop 2000, 33(SII):98.

Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, Serufo JC, Antunes CM, Genaro O, Carneiro M. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. Rev Soc Bras Med Trop 2006, 39(5):421-7.

Mott KE, Desjeux P, Moncayo A, Ranque P, Raadt P. Parasitoses et urbanization. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé 1991, 69(1):9-16.

Palatnik-de-Souza CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M *et al.* Impacto f canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 65(5):510-7.

Pappas MG, Hajkowski R, Hockmeyer WT. Standardization of the dot enzyme-linked immunosorbant assay (Dot_ELISA) for human visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1984, 33(6):1105-1111.

Prefeitura Municipal de Araçatuba. Conheça Araçatuba e Números Gerais. [Acesso em 11 nov 2007] Disponível em: URL: <http://www.aracatuba.sp.gov.br/>

Qu J, Zhong L, Massom-Yaszai M, Abdur-Rab M, Reed SG, Chang K –P. Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994, 88:543-5.

Rab MA, Evans DA. Detection of anti-*Leishmania* antibodies in blood collected on filter paper by the direct agglutination test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:713-715.

Reed SG, Shreffler WG, Burns Jr JM, Scott JM, Orge MG, Ghalib HW, Siddig M, Badaro R. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(6):632-639.

Reiter P, Lathrop S, Bunning M, Biggerstaff B, Singer D, Tiwari T, *et al.* Texas lifestyle limits transmission of dengue virus. *Emerg infect Dis* 2003; 9:86-9.

São Paulo - Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” – Governo do Estado de São Paulo (CVE). Doenças Agudas Transmissíveis [acesso em 11 nov 2007] Disponível em URL: http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/lvah_auto9904.htm

Schallig HDFH, Canto-Cavalheiro M, da Silva ES. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, 97(7):1015-8.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89(3):471-8.

Shaw JJ & Voller A. The detection of circulating antibody to Kala-Azar by means of immunofluorescent techniques. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1964; 58(4):349-52.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996, 91(6):671-83.

Singh S, Gilman-Sachs A, Chang P, Reed SG. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *J Parasitol* 1995, 81(6):1000-3.

Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006, 311-30.

Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PCK, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998, 351:563-5.

Sundar S, Sahu M, Mehta H, Gupta A, Kohli U *et al.* Noninvasive management of Indian visceral leishmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala-azar referral unit. *Clin Infect Dis* 2002, 35:581-6.

Sundar S, Maurya R, Singh RK, Bharti K, Chakravarty J, Parekh A *et al.* Rapid, noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody. *J Clin Microbiol* 2006a, 44(01):251-3.

Sundar S, Singh RK, Maurya R, Chhabra A, Singh V, Rai M. Serological diagnosis of Indian leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006b, 100:533-7.

Tesh R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 1995, 52(3):287-92.

Toz SO, Chang K-P, Ozbel Y, Alkan MZ. Diagnostic value of rK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey. *J Parasitol* 2004, 90(6):1484-6.

Veeken H, Ritmeijer K, Seaman J, Davidson R. Comparison of an rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. *Trop Med Int Health* 2003, 8(2):164-7.

Vieira JB, Lacerda MM, Marsden PD. National reporting of leishmaniasis: the brazilian experience. *Parasitol Today* 1990, 6(10):339-40.

Wijeyaratne PM, Jones Arsenault LK, Murphy CJ. Endemic disease and development: the leishmaniasis. *Acta Tropica* 1994, 56:349-64.

World Health Organization. Control of Leishmaniasis. Geneva: WHO; 1990. 54p.

World Health Organization (WHO). 2007a [acesso em 11 nov 2007] Disponível em:

URL <http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>

World Health Organization (WHO). 2007b [acesso em 11 nov 2007] Disponível em:

URL http://www.who.int/tdr/diseases/leish/press_release.htm

World Health Organization (WHO). 2007c [acesso em 11 nov 2007] Disponível em:

URL <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>

Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EAG, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop Med Int Health* 2001, 6(2):108-13.

8- ANEXO

9- APÊNDICES

Apêndice 1- Avaliação de Infecção de LVA Assintomática em Humanos

PROJETO: AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO DE LVA ASSINTOMÁTICA EM HUMANOS

ARAÇATUBA - 3502804 ÁREA: _____ SETOR: _____ QUARTEIRÃO: _____ Nº de Residentes _____
 Nº do Investigado _____ / _____

A) Nº DA IDENTIFICAÇÃO : _ _ / _ _ _ _	
NOME : _____	
SEXO : <input type="checkbox"/> MASCULINO <input type="checkbox"/> FEMININO	IDADE : _____ ANOS
NATURAL DE : _____	CODMUN : _____
QUANDO TEMPO MORA EM ARAÇATUBA ? _____ ANOS	_____ MESES
B) MORBIDADE PRÉ-EXISTENTES ATUALMENTE	
<input type="checkbox"/> 1 - DIABETES MELITUS	<input type="checkbox"/> 5 - LINFOMAS
<input type="checkbox"/> 2 - PORTADOR DO VÍRUS HIV	<input type="checkbox"/> 6 - TUBERCULOSE
<input type="checkbox"/> 3 - DOENÇA DE CHAGAS OU LTA	<input type="checkbox"/> 7 - HEPATITES
<input type="checkbox"/> 4 - CARDIOPATIA / NEFROPATIA	<input type="checkbox"/> 8 - OUTROS CARCINOMAS
<input type="checkbox"/> 09 - OUTRAS(S) _____	
C) TRATAMENTOS REALIZADOS	
<input type="checkbox"/> 1 - TRANSPLANTADO QUANDO? _____ / _____ / _____	<input type="checkbox"/> 4 - CORTICÓIDE VIA ORAL. DESDE QUANDO? _____ / _____ / _____
<input type="checkbox"/> 2 - TOMA IMUNOSSUPRESSOR. DESDE QUANDO? _____ / _____ / _____	<input type="checkbox"/> 5 - L.V.A QUANDO _____ / _____ / _____
<input type="checkbox"/> 3 - FAZ QUIMIOTERAPIA DESDE QUANDO? _____ / _____ / _____	<input type="checkbox"/> 6 - OUTRO: _____ QUANDO _____ / _____ / _____
PREENCHER SOMENTE UMA VEZ POR RESIDÊNCIA	
D) TEM CÃES? 1 - NÃO (IR PARA QUESTÃO "E") <input type="checkbox"/> 2 - SIM <input type="checkbox"/> QUANTOS? _____	
NOMES:	
1) _____	IDADE : _____ RAÇA : _____
2) _____	IDADE : _____ RAÇA : _____
3) _____	IDADE : _____ RAÇA : _____
4) _____	IDADE : _____ RAÇA : _____
E) JÁ TEVE CÃES NOS ÚLTIMOS 02 ANOS? 1 - NÃO <input type="checkbox"/> 2 - SIM <input type="checkbox"/> HÁ QUANTO TEMPO? _____ MESES OU ANO	
F) POR QUE NÃO TEM MAIS ? _____	
G) SE MORREU: DO QUE MORREU ? _____	
H) TEM QUINTAL? 1 - NÃO <input type="checkbox"/> 2 - SIM <input type="checkbox"/> 2-1 - MENOR 200 M² <input type="checkbox"/> 2-2 - MAIOR 200 M² <input type="checkbox"/>	
I) CARACTERÍSTICAS DO QUINTAL?	
<input type="checkbox"/> 1 - GRAMADO	<input type="checkbox"/> 3 - CIMENTADO
<input type="checkbox"/> 2 - POMAR/ÁRVORES	<input type="checkbox"/> 4 - MATO
<input type="checkbox"/> 5 - HORTA	<input type="checkbox"/> 6 - ENTULHOS
OUTRAS CARACTERÍSTICAS _____	
J) TEM OUTROS ANIMAIS? 1 - SIM <input type="checkbox"/> 2 - NÃO <input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> 1 - GALINHA	<input type="checkbox"/> 3 - CAVALO
<input type="checkbox"/> 2 - COELHO	<input type="checkbox"/> 4 - HAMISTER
<input type="checkbox"/> 5 - OUTROS ANIMAIS	_____
K) ALGUÉM NA CASA CONHECE O INSETO QUE TRANSMITE LEISHMANIOSE? 1 - NÃO <input type="checkbox"/> 2 - SIM <input type="checkbox"/>	
ONDE VOCÊ VIU ? _____	
L) ALGUÉM JÁ VEIO FAZER CAPTURA DO VETOR AQUI? 1 - NÃO <input type="checkbox"/> 2 - SIM <input type="checkbox"/>	
QUANDO? _____	ENCONTROU 1 - NÃO <input type="checkbox"/> 2 - SIM <input type="checkbox"/>
M) ALGUÉM JÁ VEIO FAZER BORRIFICAÇÃO AQUI ? 1 - NÃO <input type="checkbox"/> 2 - SIM <input type="checkbox"/>	
QUANDO? _____	QUANTAS VEZES? _____

Apêndice 2- Termo de Consentimento



Carta de consentimento pós-informação a ser obtida de habitantes de
Araçatuba/SP, para participação no estudo intitulado:



“Detecção de infecção humana assintomática por *Leishmania chagasi* em Araçatuba / SP”

Nome:.....

Idade:..... anos RG:

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se menor ou incapacitado):.....

RG:..... Grau de parentesco:.....

Endereço:.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue a ser obtida por punção venosa. Estou ciente de que esta amostra será utilizada para a avaliação de infecção por *Leishmania* sp. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização deste exame. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar Sandra Cristina Barão, pesquisadora responsável, no telefone (18) 3623-7083.

Qualquer reclamação sobre os procedimentos do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da FCM - UNICAMP, no telefone (19) 3788-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....
Assinatura

.....
Assinatura do responsável legal

Araçatuba, / / 2004

Apêndice 3- Artigo

Am. J. Trop. Med. Hyg., 77(6), 2007, pp. 1051-1053
Copyright © 2007 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Human Asymptomatic Infection in Visceral Leishmaniasis: A Seroprevalence Study in an Urban Area of Low Endemicity. Preliminary Results

Sandra C. Barão, Vera L. de Fonseca Camargo-Neves, Mariângela R. Resende, and Luiz J. da Silva*

Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil; Superintendência de Controle de Endemias, Grupo de Estudo em Leishmaniose, Secretaria de Estado de Saúde, São Paulo, SP, Brazil

Abstract. Many aspects of the human asymptomatic visceral leishmaniasis (VL) remain not elucidated, and moreover, almost all the data come from highly endemic areas. The recent appearance of American VL (AVL) in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil, offered a good opportunity for further understanding. We present the preliminary results from a seroprevalence study on AVL in humans in Araçatuba, São Paulo. This was a cross-sectional survey on a random sample of the population (one-stage simple random sampling) in two areas, using rK39 dipstick tests. The sex ratios and age distributions in the two areas were comparable. Detectable antibodies were found in 23 subjects (20%) in area A1 and in 6 subjects (4.8%) in area A2. There was no significant difference in age distribution of seropositivity between the areas. We observed a difference in asymptomatic infection rates between the two areas, possibly associated with socioeconomic levels and transmission intensity.

INTRODUCTION

In Brazil, human visceral leishmaniasis (VL) occurs predominantly in the northeastern states (90% of all cases) but has urbanized and disseminated throughout the country since the 1980s, to reach southeastern urban areas.¹ In 1998 and 1999, the first canine and human autochthonous cases were reported in Araçatuba in the northeastern part of the state of São Paulo,² and the vector *Lutzomyia longipalpis* was reported for the first time in the region in 1997.³ *L. longipalpis* is only found in urban areas in the region.

The introduction of VL transmission in the region motivated an intensive control program using the traditional measures of infection detection in dogs, with culling of seropositive animals and insecticide spraying of households during the rainy season. In parallel, epidemiologic and control studies were undertaken to understand the epidemiology of VL in the region.

Because almost all data substantiating the existing control measures derive from areas of high-level transmission, there is a need to generate epidemiologic data on VL in this region, which is apparently an area of medium-level transmission.

Existing data in Brazil suggest that from 12% to 20% of infected humans may develop clinically overt disease, but this is linked to the prevalence of childhood malnutrition and possibly to other factors. Recent literature has correlated asymptomatic infection to clinical cases, thus suggesting occurrence in clusters and, in at least one study, implying that asymptomatic humans could constitute a reservoir.^{4,5}

This study was conducted to obtain preliminary data on asymptomatic human VL infection in the urban area of Araçatuba and to identify possible contributory factors, such as sex, age, presence of dogs in the household, or human cases in the area.

This study also had the secondary objective of testing the usefulness of the K39 dipstick test for routine use in control programs. Although it is accepted that this test is not the most sensitive one for detecting asymptomatic cases, it is a fairly simple and practical test for field use and can be used in quick

prevalence studies to support control programs. One advantage that it has over the standard skin test is that, unlike the latter, it is able to differentiate between mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and VL, which is an important issue in this region, because MCL is common.^{6,7} This should be an important issue when planning control measures.

MATERIALS AND METHODS

Study design. The study consisted of a cross-sectional seroprevalence survey of a randomized population sample in Araçatuba, using rK39 dipstick tests. This study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Medical Sciences of the State University of Campinas.

Study area. Araçatuba has 170,000 inhabitants, and 97.64% of this population lives in the urban area of the municipality. It is at an altitude 398 m above sea level and is located 140 km from the Paraná River and the state of Mato Grosso do Sul, where canine and human VLs are endemic. It is a regional economic center, with adequate sanitation (100% of households have piped water and sewerage systems) and an active economy based on sugar cane.⁸

The city is divided into eight areas for vector-borne disease control (i.e., five urban and three rural or semi-rural areas), and each area is divided into five sectors. According to Brazilian law, rural and urban areas within a municipality are defined by the municipality itself, but urban areas usually encompass populations living in areas that have urban infrastructure and urban economic activity. Two sectors, from different urban areas, were selected, named, and justified as follows: A1, this area had the highest number of confirmed human cases up to 2003 and has low socioeconomic status (Table 1); A2, this was where the first human VL case was detected, in 1999, and is an area with good socioeconomic status and a lower number of reported cases (Table 1).

The different socioeconomic levels in the two geographic areas were inferred according to municipality urban territorial tax.

Study population. Each block and house was numbered, and a census was conducted. Residents were asked to answer a questionnaire on how long they had lived in the area, what backyard vegetation they had, and how many dogs they had. Houses were selected through a random number table.

* Address correspondence to Luiz J. da Silva, Nanuque 115 apto. A4 112, São Paulo 05302-030, Brazil. E-mail: ljsilva@unicamp.br

TABLE 1
Human VL cases in Araçatuba by year and area

Area	1999	2000	2001	2002	2003	2004*	Total
1	5	0	5	11	7	2	30
2	2	0	1	12	8	3	26
3†	4	4	5	7	4	4	28
4	0	1	4	3	1	1	10
5‡	2	2	12	12	9	1	38
6	0	0	1	1	1	0	3
7	1	0	0	2	9	0	12
8	1	0	1	2	1	2	8
Total	15	7	29	50	40	13	155

Source: SUCEN.

* Until end of May.

† A2 is sector 5 of this area.

‡ A1 is sector 5 of this area.

A nurse visited the houses selected, and the people living there were asked to participate in the study. After giving their informed consent, blood samples were taken from all residents who were > 2 years old. Data were collected regarding demographics, how long the participants had lived in the area and in Araçatuba, any previous residence in VL-endemic areas, and their existing and previous illnesses. Individuals were screened for reported symptoms, co-morbidities, and ongoing treatment. During the interview, the participants of study had answered on the presence of dogs in the house, in the present or in the preceding 2 years, presence of sick animals (dogs), and death of dogs in the residence. Governmental organizations (Superintendência de Controle de Endemias and Centro de Zoonoses) were informed of canine infection rates.

Tests. The Kalazar Detect dipstick test was used. This is an immunochromatographic test (Inbios International, Seattle, WA) that was designed for qualitative detection of antibodies against *Leishmania chagasi* rK39 antigen in serum during infection.^{9,10} Asymptomatic cases with recent and still active infection can be identified by this test.^{6,7}

The blood samples (2–3 mL) were collected from individuals, without anticoagulant, and transported at 4–8°C, and the samples were centrifuged for 10 minutes to separate the sera. In a Nunc 96-well plate, two or three drops of chase buffer per well were mixed with 20 µL of serum and finally placed on a cellulose strip. Following the manufacturer's instructions, test results were taken to be positive when two bands (a control band and a positive test band) appeared within 10 minutes. Test results were taken to be negative if only the control band appeared. The test is qualitative, and the manufacturer indicates that a faint band should be considered to be a positive result.

Statistical analysis. The sample size (*N*) was estimated based on the following data: Araçatuba had a mean number of confirmed cases of 25.6 reported for the period 1999–2004,

TABLE 2
Age distribution in areas A1 and A2

Age (yr)	A1		A2	
	Male	Female	Male	Female
2–16	16	24	9	11
17–31	8	20	7	12
32–46	11	18	9	15
47–61	8	7	7	17
≥ 62	6	7	17	21

TABLE 3
Distribution by age, sex and positive testing in area A1

A1	2–16 years	17–31 years	32–46 years	47–61 years	≥ 62 years	Percent
Male	15	8	11	8	6	
Positive male	3	3	0	1	2	18.37
Female	24	20	18	7	7	
Positive female	1	4	3	3	3	18.42

an incidence rate of 15.3 cases per 100,000 inhabitants. If this represents 10% of the infected persons, we would have ~153 cases. Our study was a pilot study, because there are still many unanswered questions on VL asymptomatic infection prevalence rate and on the K39 dipstick test. Differences in proportions for categorical variables were analyzed using χ^2 , and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The data were collected from November 9 to 23, 2004.

In area A1, there were 47 men and 78 women, with mean ages of 31.5 ± 20.97 years for the men and 30.04 ± 19.61 years for the women. In area A2, there were 50 men and 75 women, with mean ages of 44.84 ± 24.52 and 43.95 ± 21.79 years, respectively. The sex proportions were similar in the two areas. There was a significant difference between the sexes in the general population of Araçatuba, and this difference was reflected in both study areas. The age distribution for the sexes differed between the two areas (Table 2).

There were 23 positive results (18.4%; 95% CI, 11.61–25.19%) in 15 homes in area A1 (9 men and 14 women). In area A2, there were six positive results (4.8%; 95% CI, 1.05–8.55%) in five homes (three men and three women). In one home with two positive residents, there was one HIV-positive resident; however, he tested negative. The case distribution by sex and age is shown in Tables 3 and 4. Patients with active clinically VL were not identified during the period of study.

The number of dogs in both areas was high: > 100 dogs in 136 homes. Over the preceding two years, 86 dogs had died because of laboratory-confirmed VL; however, no association between positive cases and presence of dogs was found in either area.

In A2, only two homes with positive results had dogs. One home had dogs over the preceding 2 years that had not died of VL, and the remaining homes had never had any dogs previously. In six homes, there were dogs with VL, but there was no evidence of human infection.

In A1, as in A2, no association was found with dogs. There were 17 positive results in homes that had no dogs, and of these, four had never had dogs and another four had had dogs with VL. In other homes that had dogs with VL over the preceding 2 years, there were no positive results. Another two

TABLE 4
Distribution by age, sex, and positive testing in area A2

A2	2–16 years	17–31 years	32–46 years	47–61 years	≥ 62 years	Percent
Male	9	7	9	7	17	
Positive Male	0	1	0	0	2	6.12
Female	11	12	9	17	21	
Positive female	1	0	0	1	1	4.3

cases were in individuals who had or had had dogs, but without any evidence of VL. There were two individuals with positive tests in a home with dogs that died over the preceding 2 years. In 10 homes where there had been infected dogs over the preceding 2 years, there were no humans with positive results.

DISCUSSION

In areas of high endemicity, VL is mostly a childhood disease, particularly when transmission has been going on for many years.⁵ Araçatuba is an area where VL has recently appeared and presents low endemicity. In this particular region, with living conditions much better than what is usual in VL-endemic areas, the presence of symptomatic human cases is not a good indicator for the distribution of VL transmission. Therefore, the prevalence and distribution of asymptomatic cases seems to be a better alternative for understanding disease transmission and monitoring control efforts.

The data presented are the preliminary results from a study on the use of prevalence and distribution of asymptomatic human cases as an indicator for disease transmission in Araçatuba.

Normally in Brazil and other countries, VL occurs in children \leq 5 years of age. In Araçatuba, the epidemiologic context seemed different, because clinical cases were occurring at all ages (children, teenagers, and adults) and solely in urban areas. There was no correlation between age and positive serology, as also found in an outbreak described in Salvador (northeastern Brazil), possibly because both areas were places with recent *L. chagasi* transmission.¹¹ The same was found with asymptomatic cases: positive results were found in all ages.

The role of asymptomatic humans in VL transmission has recently been a subject for discussion,¹² but that was not the intention of this study. Clinical cases of VL are concentrated in certain areas of Araçatuba, mostly on the poorer outskirts of the urban area. Our data suggest a socioeconomic gradient in the distribution of asymptomatic cases. This socioeconomic gradient has been found in other vector-borne diseases, such as dengue and Indian VL.^{13,14} The presence of dogs in the home does not seem to be a significant determinant of human infection, notwithstanding evidence to the contrary from other areas.^{15,16} Possibly the presence and number of dogs in the home is easily confounded with socioeconomic factors, such as household human density or a favorable environment for *L. longipalpis* breeding.

The data from this study suggest that human infection is more common than can be inferred from the occurrence of clinical cases. Further studies are needed before seroprevalence studies in humans can become a tool for VL control programs, although this seems promising.

Received July 5, 2006. Accepted for publication July 19, 2007.

Acknowledgments: The authors acknowledge the contributions made by its field agents in Araçatuba.

Financial support: This work was supported by the Endemic Disease Control Authority (Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN).

Disclosure: Luis J. Silva is currently employed by Novartis Vaccines and Diagnostics. This statement is made in the interest of full disclosure and not because the authors consider this a conflict of interest.

Authors' addresses: Sandra C. Barão, Mariângela R. Resende, and Luiz J. da Silva, Núcleo de Vigilância Epidemiológica, Hospital de

Clínicas da Unicamp, Rua Vital Brasil, 251, Cidade Universitária Zeferino Vaz 13083-888 Campinas, SP, Brazil; E-mails: sbarao@hotmail.com, mresende@hc.unicamp.br, and ljsilva@unicamp.br. Vera L. de Fonseca Camargo-Neves, Grupo de Estudo em Leishmaniose, Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria de Estado de Saúde Av. Dr. Arnaldo, 351, 1º andar, 01246-000 São Paulo, SP, Brazil, E-mail: veracamargo@saude.sp.gov.br.

REFERENCES

1. Arias JR, Monteiro PS, Zicker F, 1996. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 2: 145–146.
2. Camargo-Neves VLF, Spinola R, Lage L, 2003. A leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo: situação epidemiológica em 2001–2002. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 27–29.
3. da Costa AIP, Casanova C, Rodas LAC, Galati ÉAB, 1997. Atualização da distribuição geográfica e o primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil; notas e informações. *Rev Saúde Públ* 31: 632–633.
4. Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, Vinhas V, Barral A, 2002. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in Northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 21–28.
5. Costa CHN, Stewart JM, Gomes RBB, Garcez LM, Ramos PKS, Bozza M, Satoskar A, Dissanayake S, Santos RS, Silva MRB, Shaw JJ, David JR, Maguire JH, 2002. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 66: 334–337.
6. Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, Jeronimo SM, 2002. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 67: 344–348.
7. Badaro R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG, 1996. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 173: 758–761.
8. Brasil, Ministério de Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sinopse Preliminar do Censo Demográfico, 2000, v.7. Brasília: Editora IBGE, 2001, 1–41.
9. Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A, Arias J, 2001. Value of a dipstick based on recombinant rK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 8: 355–357.
10. Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PCK, Murray HW, 1998. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet* 351: 563–565.
11. Cunha S, Freire M, Eulálio C, Cristóvão J, Netto E, Johnson WD Jr, Reed SG, Badaró R, 1995. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 155–158.
12. D'Oliveira A Jr, Costa S, Barbosa A, Orge M, Carvalho E, 1997. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 15–20.
13. Reiter P, Lathrop S, Bunning M, Biggerstaff B, Singer D, Tiwari T, Baber L, Amador M, Thirion J, Hayes J, Seca C, Mendez J, Ramirez B, Robinson J, Rawlings J, Vorndam V, Waterman S, Gubler D, Clark G, Hayes E, 2003. Texas lifestyle limits transmission of dengue virus. *Emerg Infect Dis* 9: 86–89.
14. Sinha PK, Ranjan A, Singh VP, Das VN, Pandey K, Kumar N, Verma N, Lal CS, Sur D, Manna B, Bhattacharya SK, 2006. Visceral leishmaniasis (kala-azar)—the Bihar (India) perspective. *J Infect* 53: 60–64.
15. Zerpa O, Ulrich M, Benitez M, Avila C, Rodriguez V, Centeno M, Belizario D, Reed SG, Convit J, 2002. Epidemiological and immunological aspects of human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1079–1083.
16. Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, Antunes CM, Carneiro M, 2005. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 456–463.