

## OCORRÊNCIA DE *Leishmania* spp. NA POPULAÇÃO CANINA DOMICILIADA E HUMANA DE TRÊS LAGOAS, MATO GROSSO DO SUL E ANÁLISE ESPACIAL

Maria Angelina da Silva Zuque<sup>1</sup>  
Suzane Manzini<sup>2</sup>  
Thainá Valente Bertozzo<sup>1</sup>  
Maria Fernanda Alves Martin<sup>1</sup>  
Mirian dos Santos Paixão<sup>1</sup>  
Wesley José dos Santos<sup>1</sup>  
Lívia Maisa Guiraldi<sup>1</sup>  
Gabriela Pacheco Sanchez<sup>3</sup>  
Cilmery Suemi Kurokawa<sup>1</sup>  
Isabella Neves Aires<sup>4</sup>  
Nássarah Jabur Lot Rodrigue<sup>1</sup>  
Simone Baldini Lucheis<sup>2</sup>

### RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV), doença negligenciada de caráter crônico e sistêmico, causada pelo parasita *Leishmania* spp. representa um problema de Saúde Pública, principalmente em países com população vulnerável, como o Brasil. Devido à urbanização de grandes centros, cães infectados por este parasito representam um importante reservatório no ciclo urbano, precedem a doença humana e contribuem para a manutenção de casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC). O objetivo do estudo foi identificar a ocorrência de *Leishmania* spp. na população canina domiciliada e humana de Três Lagoas – MS, Brasil, pelo uso das técnicas de Dual Path Platform (DPP), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e análise por georreferenciamento. Foram coletadas 566 amostras sanguíneas de cães. Além disso, informações epidemiológicas adicionais foram coletadas do sistema de saúde do município, e posteriormente, a análise espacial foi realizada. Como resultados obteve-se 267 amostras reagentes ao teste DPP, 267 amostras reagentes ao ELISA e 97 à RIFI, com 95% de concordância entre os métodos DPP e ELISA. Das amostras submetidas à PCR, 16 foram positivas para *Leishmania* spp. O uso do georreferenciamento para LVC canina em Três Lagoas forneceu subsídios para identificar áreas com prioridade de intervenção para o controle da doença. A presença de flebotomíneos, associado à localização geográfica, bem como às condições ambientais na região estudada, foram favoráveis à sua disseminação, bem como à transmissão da doença aos cães e a humanos.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral, infecção natural, caninos, diagnóstico.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais – Faculdade de Medicina de Botucatu-FMB, Universidade Estadual Paulista - UNESP. angelina\_zuque@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. APTA/SAA/Bauru Correspondência: suzane.manzini@unesp.br

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-FMVZ- Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu. pacheco.sanchez.gabriela@gmail.com

<sup>4</sup> Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Bauru. aires.isabella@gmail.com

## OCCURRENCE OF *Leishmania* spp. IN CANINE DOMICILED AND HUMAN POPULATION OF THREE LAGOAS, MATO GROSSO DO SUL AND SPATIAL ANALYSIS

### ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL), a neglected disease of chronic and systemic character, caused by the parasite *Leishmania* spp. represents a public health problem, especially in countries with vulnerable population, such as Brazil. Due to urbanization, dogs constitute an important reservoir in the disease's urban cycle, preceding human cases, and contributing to the maintenance of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL). However, few serological surveys added to the spatial analysis involving human and animal populations have been described in Três Lagoas. Therefore, the aim of this study was to identify the occurrence of *Leishmania* spp. in the human and domiciled canine population of Três Lagoas - MS, Brazil, using the techniques of Dual Path Platform (DPP), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Indirect Immunofluorescence Reaction (RIFI), Polymerase chain reaction (PCR) and spatial analysis. For this study, 566 blood samples were collected from dogs. In addition, epidemiological information was collected from the municipal health system, and subsequently, spatial analysis was performed. As a result, 267 samples were reactive to the DPP test, 267 reactive to ELISA and 97 reactive to RIFI, with 95% of agreement between the DPP and ELISA methods. Sixteen samples submitted to PCR were positive for *Leishmania* spp. The use of georeferencing for canine CVL in Três Lagoas provided subsidies to identify areas that needed priority intervention for the control of Leishmaniasis. The presence of sandflies, associated with the geographic location, as well as the environmental conditions in the studied region, favored their dissemination, as well as the transmission of the disease to dogs and humans.

**Keywords:** Visceral Leishmaniasis, natural infection, canines, diagnosis.

## PRESENCIA DE *Leishmania* spp. EN POBLACIÓN HUMANA Y DOMICILIADA CANINA DE TRES LAGOAS, MATO GROSSO DO SUL Y ANÁLISIS ESPACIAL

### RESUMEN

La leishmaniosis visceral (LV), enfermedad desatendida de carácter crónico y sistémico, causada por el parásito *Leishmania* spp. representa un problema de salud pública, principalmente en países con población vulnerable, como Brasil. Debido a la urbanización de los grandes centros, los caninos constituyen un importante reservorio del ciclo urbano de la enfermedad, precediendo casos humanos, además de contribuir para el mantenimiento de casos de Leishmaniosis Visceral Canina (LVC). A pesar de ello, pocos estudios epidemiológicos sumados al análisis espacial involucrando la población humana y animal fueron descritos en el municipio de Três Lagoas. El objetivo del estudio fue identificar la ocurrencia de *Leishmania* spp. en la población canina domiciliada y la población humana de Três Lagoas – MS, Brasil, utilizando las técnicas de *Dual Path Platform* (DPP), *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), la *Reacción de Immunofluorescencia Indirecta* (RIFI), *Reacción en cadena de la polimerasa* (PCR) y análisis de georreferenciamiento. Para eso, fueron colectadas 566 muestras sanguíneas de caninos. Además, informaciones epidemiológicas adicionales fueron colectadas del sistema de salud del municipio para la realización del análisis espacial. Como resultados se obtuvieron 267 muestras positivas para DPP, 267 muestras positivas para ELISA y 97 muestras positivas para RIFI, con 95% de

concordância entre los métodos DPP y ELISA. De las 566 muestras destinadas para PCR, 16 fueron positivas para *Leishmania* spp. El uso del georreferenciamento para LVC en Três Lagoas ayudó a identificar áreas con prioridad de intervención para el control de la enfermedad. La presencia de flebotómicos, asociada a la localización geográfica, así como las condiciones ambientales en la región estudiada, se mostraron favorables para la diseminación y para la transmisión de la enfermedad a los caninos y humanos.

**Palabras-clave:** Leishmaniosis visceral, infección natural, caninos, diagnóstico.

## INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença infecciosa crônica e sistêmica causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Existem mais de 20 espécies já descritas e na América Latina a principal espécie descrita é a *Leishmania infantum* (*L. infantum*). É considerada uma enfermidade negligenciada e importante problema de saúde pública no país, uma vez que se não tratada mais de 90% dos casos podem evoluir para óbito (1, 2).

A maioria dos casos mundiais ocorre no Brasil, leste da África e na Índia. É considerada uma das principais doenças parasitárias com potenciais surtos e alta mortalidade, além de ser estimado cerca de 50 a 90 mil novos casos ao ano no mundo. Em 2019, a Organização Mundial de Saúde relatou que cerca de 90% dos novos casos de Leishmaniose Visceral ocorreram em 10 países, a saber: Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (3).

Nas Américas, o Brasil é responsável por relatar 97% dos casos de LV e a doença é encontrada em todas as regiões do país, com destaque para a região Nordeste, que concentra cerca de 90% dos casos notificados (2, 3).

No Brasil, os vetores relacionados com a transmissão da doença em cães e humanos são duas espécies de flebotómicos, *Lutzomyia longipalpis* (principalmente) ou *Lutzomyia cruzi*, encontrada em áreas específicas dos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (2).

A industrialização do município de Três Lagoas (MS), principalmente de papel e celulose, fez com que a pecuária e a mata nativa da região fossem substituídas progressivamente por reflorestamento de eucalipto. Por estes motivos vem ocorrendo expansão da área urbana e o aumento da população em Três Lagoas, município alvo deste estudo. Novos loteamentos surgem na periferia destes municípios e existe a presença de um número significativo de animais domésticos nas residências, principalmente o cão, importante fonte de infecção para LV em humanos. Outro fator é o desmatamento porque reduz a disponibilidade de fonte alimentar para os flebotómicos, expondo o cão e humanos, que se tornam as fontes mais acessíveis. Além disso, o intenso processo migratório provoca o deslocamento de pessoas que levam seus animais domésticos, muitas vezes infectados, o que também contribui para a expansão e urbanização da doença (2).

As técnicas de geoprocessamento são ferramentas importantes de análise das relações entre o ambiente e eventos relacionados à saúde, as quais podem ser utilizadas na análise dinâmica de difusão espacial das doenças e suas relações com o ambiente, na avaliação da situação de saúde de populações e na identificação de regiões e grupos sob risco de adoecer (4).

Diante do exposto acima, e, considerando a expansão da LV no Mato Grosso do Sul e a escassez de pesquisa na região, realizou-se este estudo em Três Lagoas com o objetivo de verificar a ocorrência da infecção natural por *Leishmania* spp. em cães domiciliados, descrever aspectos epidemiológicos dessas doenças na população canina e humana, seus vetores, e realizar a análise espacial da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) empregando técnicas de georreferenciamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Tipo de estudo e coleta de dados

Trata-se de um estudo transversal e descritivo realizado no período de 2013 a 2014 em Três Lagoas, município situado na região leste do Estado de Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil.

Para a realização do estudo, os dados dos casos humanos de Leishmaniose Visceral foram coletados do Sistema Nacional de Agravos e Notificação (SINAN) e Vigilância Epidemiológica do Núcleo Regional de Saúde/TL da Secretaria Estadual de Saúde. Os dados dos vetores foram provenientes do Laboratório de Entomologia de Três Lagoas e Núcleo Regional de Saúde/TL e de captura em armadilha com isca luminosa em uma área verde. Os dados de LVC foram coletados num inquérito realizado no Centro de Controle de Zoonoses de Três Lagoas (CCZ/TL) que consideram, inclusive, os casos para LV sem diagnóstico sorológico (apenas diagnóstico clínico).

As provas sorológicas para diagnóstico de LVC das amostras de sangue dos cães foram realizadas no CCZ/TL, sendo utilizado para triagem o teste rápido Dual Path Platform (DPP®) e para confirmação o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (5). Os procedimentos laboratoriais de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum* das amostras de sangue canino e análise molecular Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em sangue dos cães foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA/SAA) - Polo Centro-Oeste, Bauru (SP).

### Área do estudo

O estudo foi realizado na região de Três Lagoas, referência na assistência à saúde para as cidades próximas, no período de 2013, 2014 e 2015 sendo a população humana de 162.803, 165.578 e 168.226 habitantes respectivamente, a maioria deles residentes na área urbana. Quanto à população canina, o censo canino de Três Lagoas em 2013 registrou 20.336 cães, relação de um cão para cada 5,4 habitantes (6).

### Cálculo do tamanho amostral

Utilizou-se amostra não probabilística de conveniência perfazendo um total de n=566 em Três Lagoas da população canina.

### Aspectos éticos

O estudo teve autorização dos órgãos competentes da Secretaria do Meio Ambiente de Três Lagoas e do Centro de Controle de Zoonoses de Três Lagoas e pela aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB/UNESP, número do parecer 476.698.

### Coleta de sangue de cães

Amostras de 5 a 10 mL de sangue, em tubos contendo EDTA (para biologia molecular) e em tubo seco (para sorologia), dos cães foram coletadas por técnicos do CCZ/TL de Três Lagoas durante o inquérito sorológico canino. As amostras foram acondicionadas em caixas

térmicas sob refrigeração até a chegada ao laboratório para posterior centrifugação e obtenção dos soros, e posteriormente armazenados em freezer a -20°C.

O inquérito no município foi realizado em duas áreas: Área I (denominada São Carlos), que abrange os bairros Vila Carioca, Vila Maria, Vila Guanabara, Jardim das Orquídeas, Osmar Dutra, Jardim Planalto e parte do São Carlos; e Área II (denominada Vila Piloto), que abrange a Vila Piloto I, II, III, IV e V.

### **Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* spp. em soro**

A técnica de RIFI foi realizada utilizando como antígenos as formas promastigotas de *L. infantum* mantidos em tubos rosqueados contendo 10 mL de meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e 5 mL de meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), repicados semanalmente.

Os parasitos foram quantificados com o auxílio de microscopia óptica. O antígeno era obtido quando se visualizava de 20 a 30 parasitas por campo microscópico.

### **Dual Path Platform (DPP®) em amostras de soro**

Para o teste de triagem foi utilizado o Teste Rápido (TR DDP®) Leishmaniose Visceral Canina – Biomanguinhos de acordo com as recomendações do fabricante (7).

### **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) em amostras de soro**

O Ensaio Imunoenzimático para LVC – Bio-Manguinhos foi realizado de acordo com o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos (8, 7).

### **Extração de DNA em amostras de sangue**

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras de sangue total utilizando-se o Kit comercial Illustra Blood Genomic Prep mini Spin Kit da GE Healthcare®, de acordo com as recomendações do fabricante.

### **Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para família Trypanosomatidae/ *Leishmania infantum***

Como forma de triagem para a família Trypanosomatidae, utilizou-se os iniciadores da região ITS1. Os primers utilizados foram o LITSR [5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'] e L5-8S [5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'] (9).

Cepas de *L. major* (MHOM/BR/IOC/2906) ou *L. infantum* (MHOM/BR/IOC/2821) e Cepa Y de *Trypanosoma cruzi* mantidas em meio NNN acrescido de LIT foram os controles positivos e a água ultrapura, o controle negativo (9).

Após triagem, foi realizada a técnica de PCR para *L. infantum*. As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System 9600) contaram com uma desnaturação inicial em um ciclo de 95°C por 1 minuto, seguido de 33 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto e uma extensão final de 72°C durante 7 minutos. Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA de *Leishmania infantum* foram utilizados os iniciadores LINR4 [5'-GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3'] e LIN19 [5'-CAGAACGCCCTACCCG-3']. Os produtos resultantes apresentaram 720 pares de base (pb)(10).

## Eletrforese em gel de agarose

Realizou-se eletrforese em gel de agarose a 1,5% corado em solução de Syber Safe® para a identificação da amplificação dos produtos. As bandas foram visualizadas em transiluminador ultravioleta. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o DNA Ladder de 100pb.

Se após a eletrforese obteve-se bandas indicando amostras positivas a família Trypanosomatidae (primers da região ITS1), realizou-se PCR utilizando-se iniciadores específicos para o gênero *Leishmania* spp e após a reação, novamente realizou-se eletrforese para conferência de amplificação.

## Georreferenciamento

No estudo, foram adotados procedimentos metodológicos a partir da geocodificação dos casos de LVC, do censo canino, total dos cães participantes por Inquérito Sorológico Canino (ISC) e casos de LVH, direcionados à base territorial para geoprocessar e gerar mapas temáticos.

Para análise espacial, utilizou-se a base de municípios do IBGE, somando o número de casos do ano e associando esse valor a área do município. Para cada ano do período de estudo, após a obtenção dos dados por área, a base foi exportada em formato *shapefile* para o programa Terra View 4.2, onde foram realizados os procedimentos de análise da distribuição espacial dos casos de LVC e LVH. Além disso, foram utilizados os dados por áreas para trabalhar com análises epidemiológicas, prevalência e incidência.

Para identificação de aglomerados e dispersão dos dados, foram elaborados mapas de estimador de intensidade de Kernel, numa evolução espaço-temporal, a fim de identificar diferentes padrões de distribuição da doença para obter a concentração dos casos de LVC com a ocorrência de aglomerado espacial, que mostra a localização real dos dados por meio de uma malha, uma superfície interpolada em que se analisa a concentração dos casos, denominado de *cluster* (11). Esse mapa permitiu, por meio de interpolação, estimar a densidade dos números de casos de LVC para todo o município.

## Análise Estatística

Os dados coletados foram armazenados em Excel (*Microsoft*®) e consolidados em planilhas, tabelas, gráficos e mapas, para posterior análise. Foi realizada análise descritiva dos dados. Foram utilizadas taxas de incidência e prevalência para as análises epidemiológicas e, para as análises dos dados, utilizou-se o software Estatística 8.0.

Foram comparados os resultados dos métodos sorológicos (RIFI, ELISA e DPP) para saber se houve diferenças significativas nos testes através do teste estatístico Qui-Quadrado e o teste de Pearson, para a comparação de frequências de ocorrência. Para a concordância nos diagnósticos sorológicos, foi calculada usando-se o índice *Kappa* (*k*).

## RESULTADOS

### Sorologia e diagnóstico molecular

Ao comparar os resultados dos diferentes métodos sorológicos utilizados no presente estudo foi possível observar que, de acordo com as frequências comparadas, o teste DPP® e ELISA são similares. Entretanto a RIFI não foi considerada confiável, uma vez que detectou

apenas 97 das amostras consideradas positivas e, conseqüentemente, não é indicada para diagnóstico.

Considerando os testes sorológicos DPP® e ELISA, do total das 566 amostras testadas, 267 apresentaram resultado reagente, perfazendo uma positividade de 47% das amostras.

No estudo, a concordância entre os testes no diagnóstico sorológico foi realizada (*kappa*). Os testes DPP® e ELISA revelaram concordância ótima. Não ocorrendo o mesmo quando estes foram comparados com a RIFI.

Em relação às amostras reagentes dos testes sorológicos quando comparados simultaneamente, 267 foram reagentes para DPP® e ELISA; 86 para DPP®, ELISA e RIFI, 13 para DPP® e RIFI e apenas uma para ELISA e RIFI.

### **Leishmaniose Visceral Canina**

A eutanásia foi feita pelo CCZ de Três Lagoas e foi realizado sem diagnóstico laboratorial, considerando apenas os sintomas clínicos. Desta forma, foram eutanasiados 6114 cães que apresentaram os sintomas clínicos e 2103 que foram reagentes a sorologia, totalizando 8217 cães eutanasiados no período de 2013 a 2014.

### **Dados Entomológicos – Flebotomíneos**

Em relação a presença de *L. longipalpis* capturados nos bairros de Santa Luzia, Santa Júlia, Colinos, Vila Nova, Vila Piloto, São Carlos e Santos Dumont. Com relação a região intradomiciliar referente a esses bairros, em 2013 foram encontrados 28 flebotomíneos *L. longipalpis* machos e 17 fêmeas; e no âmbito peridomiciliar foram 51 machos e 16 fêmeas. No ano de 2014, no âmbito intradomiciliar não foram encontrados nenhum flebotomíneo, no entanto em peridomicílio detectou-se 76 machos e 23 fêmeas. Deste modo, os flebotomíneos têm sido encontrados em sua maioria nos peridomicílios, mas em 2013 foram encontrados também no intradomicílio.

### **Análise Espacial**

#### **Dados sociodemográficos a partir de levantamento pelo IBGE, 2010**

No mapa A da Figura 1 pode ser verificado que as áreas menos povoadas, como o cinturão verde, área suburbana e os novos loteamentos, são as que apresentam as maiores taxas sem abastecimento de água, pois concentram grandes áreas vazias com baixa densidade populacional.

No Mapa B da Figura 1, observa-se que a maior concentração de crianças menores de 11 anos encontra-se nos bairros da periferia do município, não coincidentemente é a área onde também se observa a concentração da população com a menor renda domiciliar mensal (Mapa C, Figura 1).

#### **Análise espacial do censo canino e casos de LVC em Três Lagoas a partir de levantamento do IBGE, 2010.**

Na Figura 2, observa-se nos Mapas A e B, pela distribuição espacial no período do estudo, a densidade de cães obtida pelo censo canino e o número de casos de LVC de Três Lagoas em 2013 e 2014, caracterizando a endemicidade da doença na área urbana uma vez que existe a ocorrência de casos em todos os bairros do município.

Observa-se que, nesse período, alguns bairros mantiveram o mesmo comportamento da doença, porém observou-se que no ano de 2014 ocorreu aumento da frequência de casos em outros bairros como Vila Nova, Maristela, São Carlos, Guanabara e Vila Carioca e os três últimos fizeram parte do Inquérito Sorológico Canino (ISC) (Figura 2, Mapas A e B).

Esses bairros apresentam alta densidade populacional, ausência de tratamento de esgoto, baixo nível socioeconômico, presença de animais domésticos em sua maioria cães e gatos, muitos quintais com árvores frutíferas e outras espécies. Durante o inquérito verificou-se a presença de mais de um cão infectado no mesmo domicílio e nas áreas I e II do ISC, foi grande a reposição dos cães eutanasiados no intervalo do inquérito.

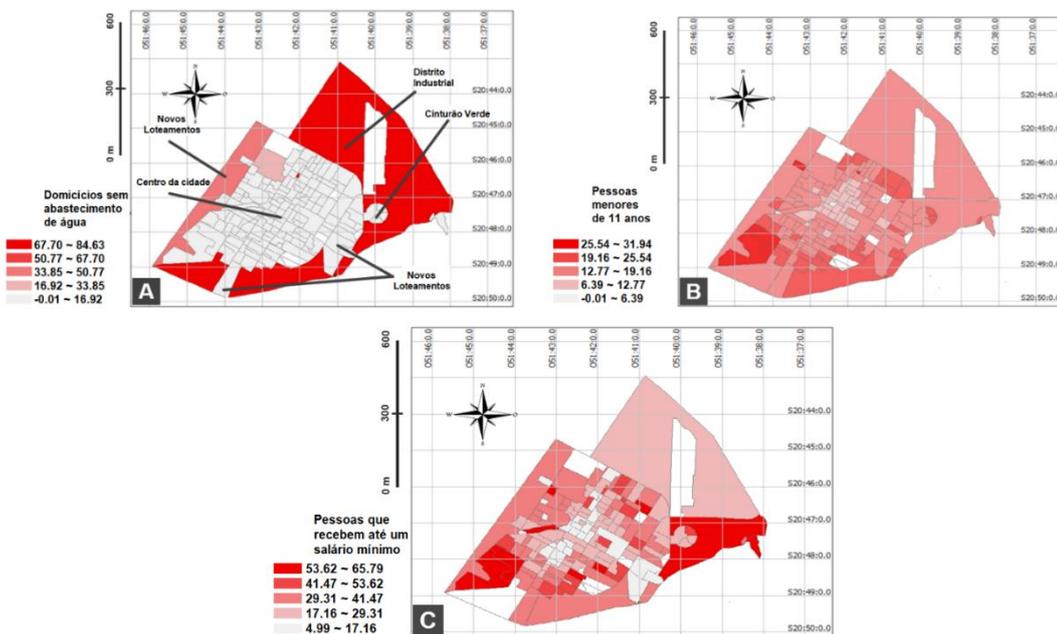
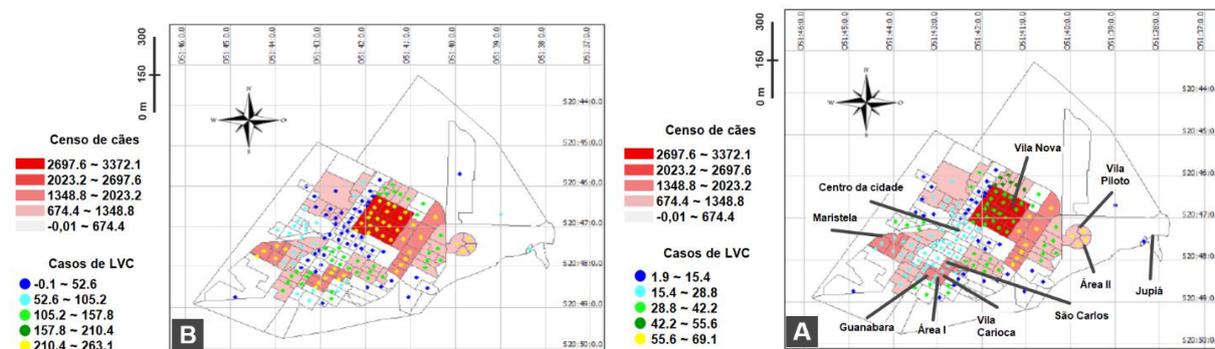


Figura 1. Mapa de 2010 do município de Três Lagoas-MS. **A)** Proporção dos municípios sem abastecimento de sistema de distribuição de água; **(B)** Proporção de pessoas com menos de 11 anos; **(C)** Proporção de pessoas com rendimento de até 1 salário-mínimo. Organização – Maria Angelina da Silva Zuque; Editoração – Danilo Pinho de Almeida; Fonte: IBGE, 2010.



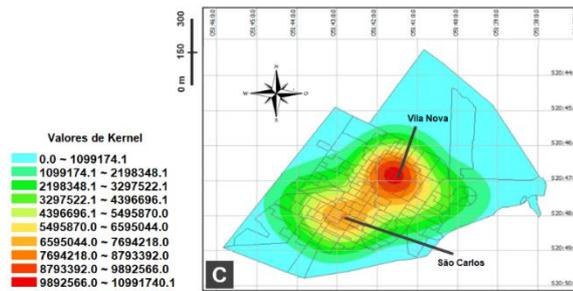


Figura 2. Análise espacial do município de Três Lagoas/MS para densidade de cães e casos de LVC. (A) Densidade de cães pelo censo canino e casos de LVC no ano de 2013; (B) Densidade de cães pelo censo canino e casos de LVC no ano de 2014; (C) Densidade de casos de LVC em 2014. Editoração – Danilo Pinho de Almeida; Fonte: IBGE, 2010.

Na figura 2, o Mapa de Kernel fornece uma visão geral da intensidade do processo em toda região e este mapa foi utilizado para calcular a intensidade da LVC em cada ano. O mapa C proporciona uma visão das áreas de dispersão ou aglomeração (*cluster*), bem como evidencia a densidade de Kernel dos números de casos de LVC no ano de 2013 e 2014, indicando uma forte concentração, *cluster*, no bairro Vila Nova (coloração vermelho intenso) e nas suas proximidades existe uma ocorrência média (laranja e amarelo intenso) e baixa intensidade nos demais bairros (verde claro). Observa-se que em 2013 e 2014 o *cluster* permanece no bairro Vila Nova (vermelho intenso) e como *cluster* secundário, isto é, com menor intensidade, fica na região de São Carlos, o que demonstra área de expansão que provavelmente identificado foi pelo ISC.

### Análise espacial de número de casos e incidência de LVC segundo exames reagentes ou sinais clínicos

Em 2013 o município realizou 1706 exames, com 632 animais reagentes. Do total de casos eutanasiados ( $n=4559$ ) estão incluídos os sintomáticos, sem exames realizados. A maioria apresentava-se com diagnóstico laboratorial do próprio CCZ ou clínicas privadas.

Em 2014 foram realizadas sorologias de 4101 cães, sendo 1471 reagentes. Aumentou a demanda da população para o recolhimento de cães sintomáticos ( $n=3658$ ) para eutanásia (Figura 3, Mapa A).

Em 2013 os bairros com maior prevalência para LVC em Três Lagoas foram Jardim Brasília com 270 casos, Vila Zuque com 101,4%, Guanabara com 76,7% e Santa Luzia com 73,5%. Já em 2014, os bairros observados com maiores prevalências foram Jardim Brasília com 729,7%, Quinta da Lagoa com 555,5%, Jupιά com 391,8% e Bela Vista com 323,4%.

Baseado na prevalência dos bairros e para refinar a análise espacial, utilizou-se a análise por *cluster*. Observa-se que, em 2013, só havia um *cluster*, que foi localizado no Jardim Brasília. Em 2014 dois *clusters* foram observados, Jardim Brasília e Quinta da Lagoa, que são áreas próximas.

Relacionado à incidência da LVC em 2013 entre os bairros que registraram as maiores taxas, temos Jardim Brasília (108.1/1000 cães), Vila Zucão (72.4/1000 cães), Vila Guanabara (53.0/1000 cães) e Vila Carioca (49.1/1000 cães). Os dois últimos bairros pertencem à área do inquérito de São Carlos, o que reforça o fato de ser uma área de risco para a doença (Figura 3, Mapa B).

Em 2014, as maiores taxas de incidência registradas foram nos bairros Quinta da Lagoa (433.3/1000 cães), Jardim Brasília (162.2/1000 cães), Bela Vista (154.2/1000 cães) e Jupιά

(140.3/1000 cães). Isso demonstra a necessidade de outros estudos para avaliação da expansão da doença com novas áreas de risco (Figura 3, Mapa C).

O bairro Jardim Brasília merece destaque por manter-se como área de transmissão intensa por dois anos consecutivos. Deste modo, fortalece a necessidade de intervenção e monitorização neste espaço.

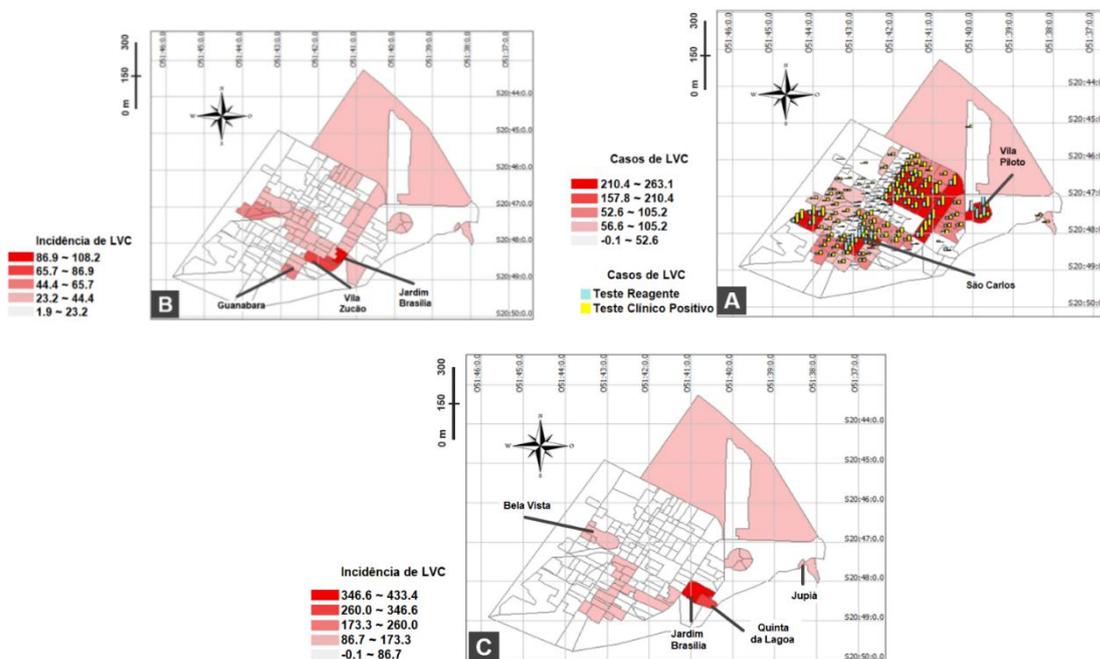


Figura 3 – Análise espacial segundo os casos de LVC para município de Três Lagoas/MS e análise de clusters. (A) Casos de LVC segundo exame reagente e ou sinais clínicos da doença, Três Lagoas, 2014; (B) Distribuição de *Cluster* para a incidência de LVC, Três Lagoas, 2013; (C) Distribuição de *Cluster* para a incidência de LVC, Três Lagoas, 2014. Editoração – Danilo Pinho de Almeida; Fonte: IBGE, 2010.

## DISCUSSÃO

A existência dos mesmos focos de *Leishmania* spp. ao longo dos anos, mesmo que em número pequeno, sugere que essas áreas representam problemas ao município. Devido a gravidade da doença e as taxas de letalidade, registros de casos leishmaniose humana e canina demonstram um importante problema de saúde que, se não controlado, podem colocar essas populações em risco.

No presente estudo, os testes ELISA e DPP® utilizados revelaram concordância ótima. Essa concordância entre os testes sorológicos também foi observada em um estudo feito em Itaúna, Minas Gerais, em 2.302 cães testados sorologicamente. Em relação aos resultados desses animais, 1.690 pertenciam à pesquisa do censo canino e 612 foram testados a partir de solicitação espontânea do proprietário. Neste estudo, 358 cães foram reagentes no teste de triagem (DPP) e 203 deles tiveram o diagnóstico de LVC confirmado por ELISA (5).

Com intuito de aperfeiçoar a técnica de diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde (7) preconizou para todos os CCZ a utilização do DPP® como teste de triagem e o teste de ELISA como confirmatório. Desta forma, é considerado resultado sorológico positivo para LVC quando as técnicas DPP® e ELISA forem reagentes. Estes dois testes são amplamente utilizados para o diagnóstico de LVC. O teste de triagem de DPP® tem a vantagem de ser de fácil realização e rapidez no resultado e ainda ser compatível com uso de sangue, soro ou

plasma. Apenas uma gota de sangue é suficiente para triagem eficaz, possibilitando o seu uso no próprio local da coleta, além de ser minimamente invasivo (7).

Em relação a técnica de RIFI, o presente estudo apresentou menor sensibilidade e especificidade quando comparada a outras técnicas sorológicas. Além de necessitar de corpo técnico treinado para a realização deste exame, o resultado é sujeito a subjetividade de interpretação na leitura das lâminas quando comparada à técnica de ELISA. Este entrave justificou a substituição do teste pelo Ministério da Saúde (7). Ademais, para que um teste de diagnóstico sorológico possa ser utilizado em um inquérito canino, este deve possuir alta confiabilidade para a triagem dos cães. Deste modo, evita a propagação da doença, possibilita a eliminação de cães positivos e a permanência dos animais negativos no local, além de proporcionar maior credibilidade entre os proprietários dos animais (12).

A PCR é eficaz na detecção de baixas cargas parasitárias e apresenta elevadas sensibilidade e especificidade. Em alguns estudos foram observados baixa sensibilidade da PCR quando utilizadas amostras sanguíneas, tendo como principal causa a possível interferência de inibidores da Taq polimerase. Além disso, a sensibilidade da PCR poderia ser incrementada se o DNA fosse extraído diretamente de outros materiais biológicos, como medula óssea, baço ou linfonodo (13).

As técnicas moleculares avançaram muito nos últimos anos e permitem o monitoramento da carga parasitária e tipificação de espécies, a detecção do parasito até mesmo antes do aparecimento dos sintomas, além da aplicabilidade em várias amostras clínicas (13).

Para contextualizar a importância da LVC, é necessário reportar os registros de Leishmaniose Visceral Humana (LVH). No período de 2000 a 2014, a regional de saúde de três Lagoas registrou 507 casos de LVH. Três Lagoas é o município com o maior número de casos (n=457) desde o ano 2000, quando ocorreu o primeiro caso, apresentando um pico em 2002 com 122 casos, mantendo-se estável com intervalos de dois a três anos e, a partir de 2009, apresentou tendência decrescente dos casos.

Nesse período, dos 58 óbitos relatados entre os municípios citados anteriormente, 49 (84%) deles ocorreram em Três Lagoas (14). Curiosamente, no período em que ocorreu o maior número de casos da doença, o número de óbitos foi proporcionalmente menor. Provavelmente devido ao fato de que nesse período a atenção à saúde talvez estivesse voltada ao diagnóstico precoce da doença.

A leishmaniose é documentada em todos os estados brasileiros e no período de 2006 a 2015, o país teve uma média anual de 21.026 casos. Somente no estado do Mato Grosso, nesse mesmo período, houve cerca de 10% do total de casos registrados no Brasil, tendo como média de casos anual de 2.628 (15).

Os casos de LV deste estudo ocorreram tanto em bairros socioeconomicamente desenvolvidos, com saneamento básico e boa infraestrutura, quanto em bairros periféricos, nos quais as casas eram de alvenaria. Além disso, no presente estudo, foi possível observar maior número de casos em crianças e indivíduos do sexo masculino.

Uma das características do município era o grande número de quadras vazias com coberturas de restos de vegetação do cerrado, como a área verde do quartel militar, situado na área central. Também era grande a quantidade de quintais com presença de árvores frutíferas. Existiam ainda, muitos terrenos baldios, até mesmo em razão dos novos loteamentos, com restos de vegetação. Esta situação favorece a expansão da *L. longipalpis*.

No Brasil, a doença é frequente em indivíduos menores de 10 anos (41,9%) e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (62,8%). A razão da maior suscetibilidade em crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (16).

Um estudo epidemiológico sobre casos de LVH em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, verificou que crianças de até nove anos contribuíram com 40% dos casos. O sexo masculino contribuiu com 64% das notificações e o sexo feminino com 36%. A letalidade variou de 5% a 11%, com média de 8%. Dos 44 óbitos, 33 (75%) ocorreram no sexo masculino e 11 (25%) no sexo feminino. Embora os idosos tenham contribuído com 9% dos casos, a mortalidade entre eles alcançou 39% (17).

Em 2013, os casos da doença ocorreram em diferentes bairros. No ano de 2014, dos oito casos notificados, observou-se a concentração no bairro São Carlos com 50% (n=4) dos casos. Esta área registrou o primeiro caso de LVH no município em 2000. Dos casos, cinco eram do sexo masculino e três do sexo feminino. Quanto a faixa etária, seis deles eram crianças de nove meses a quatro anos, um caso de 32 anos e um caso de 60 anos.

Baseado na prevalência dos bairros e para refinar a análise espacial, utilizou-se a análise por *cluster*. Observa-se que, em 2013, só havia um *cluster* que foi localizado no Jardim Brasília. Em 2014 dois *clusters* foram observados, no Jardim Brasília e Quinta da Lagoa, que são áreas próximas. Em alguns trabalhos na literatura, pode-se observar que os principais focos da doença mantêm o mesmo padrão ao longo do tempo (18).

Quanto a LVC, podemos dizer que as transformações no ambiente provocadas pelo processo migratório, questões socioeconômicas, processo de urbanização crescente, alta densidade de residências aglomeradas e o elevado número de cães, são fatores que levam a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos de leishmaniose visceral (19).

No Estado de São Paulo, por exemplo, o impacto da expansão territorial nos casos é percebido pelo aumento do número de municípios com transmissão humana autóctone de LV. No período compreendido entre 1999 a 2012, 76 municípios identificaram casos autóctones. Já no ano de 2017, esse número aumentou para 98 municípios (19).

Para a LVC, esta situação também favorece o flebotômico que para se alimentar, não necessitam se deslocar para áreas muito distantes. Uma das características do município de estudo é o grande número de quadras vazias com coberturas de restos de vegetação do cerrado, situação a qual favorece a expansão da *L. longipalpis* (15).

Para maior efetividade do planejamento e avaliação das ações para proteção e preservação da saúde de homens e animais é fundamental conhecer o tamanho da população canina e estabelecer relações entre o número de cães e os casos de doenças para dar continuidade às atividades dos programas de Vigilância Epidemiológica e de saúde, tendo em vista que os cães facilitam repasto sanguíneo pelos vetores como fontes de alimento (20). Ter conhecimento sobre a população canina permite estabelecer estratégias eficazes para as ações de controle no município (21).

O censo canino realizado na área urbana de Três Lagoas, em 2013, contabilizou 20.336 cães, ou seja, 1:5,4 habitantes, superior ao estimado pelo Ministério da Saúde de 10% da população humana, 10.709 cães. Na literatura foi encontrado que o resultado estimado do número de cães por habitantes para cidades maiores que 100 mil habitantes é uma relação de 1:4 habitantes (22).

A fim de otimizar os recursos humanos e financeiros, bem como priorizar as ações de vigilância e controle, os municípios endêmicos são estratificados segundo a intensidade de transmissão e o critério utilizado é a média anual de casos novos de LVH autóctones dos últimos três anos no município (2). Os municípios classificados como endêmicos ou com transmissão recente de LVH são estratificados em transmissão esporádica (quando a média anual de casos nos últimos três anos é  $\leq$  zero e  $<$  2,4), transmissão moderada (quando a média anual de casos nos últimos três anos é  $\geq$  2,4 e  $<$  4,4), e transmissão intensa (quando a média anual de casos humanos nos últimos três anos é  $\geq$  4,4) (5).

A situação epidemiológica de Três Lagoas é propícia para o surgimento de novos casos humanos em razão da LVC porque é considerada de transmissão intensa devido os casos de LVH ocorrido nos últimos anos (15).

Áreas com taxas de prevalência de LVC superiores a 2% devem ser consideradas prioritárias para implantação das medidas de controle contempladas no programa de controle da leishmaniose e a vigilância em saúde para conter a expansão da doença (16).

Segundo o levantamento realizado por este estudo no CCZ/TL, a soroprevalência de LVC do município Três Lagoas no período de 2013 a 2014, foi de 29%. Os dados de Três Lagoas incluem os dados do inquérito sorológico canino e a demanda espontânea da população (19).

Os inquéritos são considerados ferramentas importantes para detectar focos silenciosos da doença e delimitar as regiões prioritárias para execução de medidas de controle a partir da identificação dos locais de maior prevalência canina (2).

A remoção e eutanásia dos cães infectados pela *Leishmania* spp. ocorrem mediante o resultado reagente em dois testes sorológicos (DPP® e ELISA) e são recomendadas pelo Ministério da Saúde como uma ação integrada a demais ações de controle da doença (5).

A remoção dos cães positivos se mostrou eficaz para diminuir a carga da doença canina e teve influência na incidência na LVH na Bahia e em Minas Gerais (23). Entretanto, esta medida apresenta efeito temporário e é insuficiente quando considerada de forma isolada no controle da LVC. Porém, quando adotada em conjunto com outras recomendações do Ministério da Saúde, o tratamento dos casos humanos e controle vetorial podem ser eficazes no combate à doença em áreas endêmicas.

Entretanto, existe muita controvérsia em relação à eutanásia como medida de controle da doença pela população e sociedade protetora dos animais. Alguns estudos não conseguiram comprovar esse êxito em várias localidades brasileiras (5).

Três Lagoas possuem casos humanos e caninos autóctones devido aos fatores de proximidade com cidades que apresentam a ocorrência de LVC, a rodovia que passa pelo município interligando Mato Grosso do Sul ao estado de São Paulo que possibilita o intercâmbio de animais com LVC de outras cidades, a presença do vetor e às condições climáticas que são favoráveis à manutenção da doença (24). Esse fator foi bem descrito no estudo feito em janeiro de 2007 a dezembro de 2019, que foi identificado cerca de 1100 casos de LV e que os autores citam como contribuição desse aumento de casos, as cidades vizinhas pertencentes ao Estado de São Paulo, como Araçatuba que possuem alta incidência de LV (24).

As investigações entomológicas são importantes e tem o objetivo de levantar as informações de caráter quantitativo e qualitativo sobre os flebotomíneos transmissores da LV. Entender os vetores são fundamentais para auxiliar no planejamento de medidas preventivas e de controle (15).

As condições ecológicas da região do estudo são favoráveis para a transmissão da LV e a disseminação dos criadouros de flebotomíneos, pois apresenta temperaturas médias entre as mínimas de 18 a 22°C e entre as máximas de 25 a 28°C. A umidade relativa do ar fica entre 50 a 90% e a precipitação média anual entre 1100 e 1500 mm (6). A quantidade desses insetos está relacionada com fatores ambientais, como a precipitação pluviométrica e presença de matéria orgânica, além de se replicarem quando a temperatura aumenta (25).

Em um estudo realizado no município de Três Lagoas, no período de 2000 a 2006, verificou-se que *L. longipalpis* foi o flebotomíneo mais encontrado em relação às outras espécies. A predominância no ambiente doméstico e peridoméstico na zona urbana foram de 87%, especialmente na região central e bairros que também foi encontrada a maior prevalência de casos humanos e caninos de LV (26). Tais dados evidenciaram o seu papel na transmissão local da leishmaniose.

As ferramentas de Sistemas de Informação Geográfica (SIG) e o georreferenciamento possibilitam mapear doenças, avaliar riscos, planejar ações de saúde e avaliar redes de atenção à saúde. Além disso, análises de autocorrelação espacial, de agrupamento e análise espaço-temporal, são usadas para descreverem padrões espaciais de doenças e de incidência de doenças em uma área específica. Avanços recentes no uso de SIG geram maior interesse em sua aplicação a fim de detectar tendências de doenças na vigilância em saúde pública (27).

Neste estudo, a aplicação destas ferramentas indicou a distribuição espacial das informações e as análises referentes à identificação de padrões espaciais inerentes ao município, forneceram subsídios para identificação de áreas com prioridade de intervenção para o controle da LVC.

Observou-se que a maior concentração de crianças menores de 11 anos encontra-se nos bairros da periferia do município, não coincidentemente é a área onde também se observa a concentração da população com a menor renda domiciliar mensal. Estas áreas são consideradas de vulnerabilidade para a leishmaniose, uma vez que o ambiente característico e propício a ocorrência de LV é aquele de baixo nível socioeconômico e pobreza (28).

A literatura aponta que as condições socioeconômicas, ambientais e hábitos de vida são fatores significativos na epidemiologia da leishmaniose visceral em áreas endêmicas porque permite identificar as vulnerabilidades para a doença. Conhecer esses fatores é importante para o desenvolvimento de estratégias para auxiliar o controle da leishmaniose visceral. Do mesmo modo, a população informada sobre a doença exerce um fator de proteção contra a sua ocorrência (29).

Fatores como coleta de lixo inadequada e ausência de rede de esgoto tornam o ambiente propício ao desenvolvimento e manutenção do vetor no ambiente, condições observadas em países subdesenvolvidos (21).

Um estudo feito em Belo Horizonte analisou a influência dos fatores de risco microambientais para LV urbana e concluiu que as características peridomiciliares e a presença de animais nas proximidades dos domicílios estavam associadas ao aumento quantitativo de casos de leishmaniose (14). Outro trabalho realizado em Belo Horizonte, reforça que as áreas prioritárias identificadas com LV e LVH são aquelas com maiores índices de vulnerabilidade socioeconômica e ambiental (30).

A LV é negligenciada em muitos municípios, principalmente quando as condições socioeconômicas são desfavoráveis. O risco da expansão da doença para novas áreas indica a necessidade de atenção por parte de médicos veterinários na identificação de novos casos, além da constante vigilância em saúde e implementação de medidas de educação em saúde nas áreas endêmicas (18).

Neste estudo foi encontrada nas duas áreas do inquérito, em 2014, alta positividade aos exames sorológicos e que se mantém como área de transmissão de LVH desde o início dos primeiros casos no município, em 2000, sendo consideradas áreas de risco para a leishmaniose. Os resultados permitiram visualizar aglomerados da doença com identificação de pontos de maior risco da transmissão dentro dos setores censitários de áreas urbanas.

A prevalência e incidência ocorreram em bairros periféricos, com casos previamente detectados por inquérito soropidemiológico, geralmente vizinhos a bairros com maior prevalência e/ou incidência com alternância de um bairro para outro, mas bairros vizinhos.

Realizar estudos que monitorem a presença de cães pelas ferramentas do georreferenciamento, com dados do censo canino, inquérito canino, bem como a identificação dos casos reagentes e, como resultados, a geração de mapas são importantes mecanismos para controlar a disseminação da doença. O desenvolvimento de estudos neste campo é importante para avaliar o potencial efetivo dessas ferramentas nas investigações sobre os fatores relacionados aos padrões de ocorrência e disseminação de doenças transmissíveis e, definir áreas prioritárias para implementação de medidas de vigilância e controle (31). O uso dessas

ferramentas é útil para descrever a epidemiologia, não só da LV, mas de outras doenças infecciosas (27).

Portanto, tendo em vista importância do cão na transmissão da LV, controlar a doença na população canina é fundamental para vigilância da doença como problema de saúde pública, pois é estimado que a proximidade de um cão soropositivo aumenta em cinco vezes a chance de infecção humana. Diante disso, investigar e controlar a infecção canina, é essencial para o entendimento da epidemiologia da doença, além de contribuir para o melhor direcionamento das medidas de prevenção e controle (32).

## CONCLUSÃO

Os casos de leishmaniose visceral humana persistem em áreas com transmissão da doença desde o início da epidemia no município. A presença de flebotomíneos associada às condições ambientais da região, foi favorável à sua disseminação bem como a transmissão da doença aos cães e ao ser humano. O uso do georreferenciamento para LVC no município de Três Lagoas possibilitou verificar as características da doença e os padrões espaciais da distribuição da LVC, assim como subsídios para identificação de áreas com prioridade de intervenção para o controle desta zoonose.

## AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo - FAPESP – Processo 2012/16757-0, ao Sistema Nacional de Agravos e Notificação (SINAN) e Vigilância Epidemiológica do Núcleo Regional de Saúde/Três Lagoas, à Secretaria Estadual de Saúde, ao Laboratório de Entomologia e ao Núcleo Regional de Saúde do Estado – Departamento de Saúde (NRS/TL), ao Centro de Controle de Zoonoses de Três Lagoas (CCZ/TL), ao Laboratório de Sanidade Animal de Bauru e ao Danilo Pinho de Almeida.

## REFERÊNCIAS

1. Bi K, Chen Y, Zhao S, Kuang Y, John Wu CH. Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. *Biomed Res Int.* 2018 Jul 10;2018:9872095. doi: 10.1155/2018/9872095. PMID: 30105272; PMCID: PMC6076917
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único – 3ª. ed. – Brasília: Ministério da Saúde. 2019.
3. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. 2021 Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso 01 mai 2021.
4. Iliopoulou P, Tsatsaris A, Katsios I, Panagiotopoulou A, Romaliades S, Papadopoulos B, et al. Risk mapping of visceral leishmaniasis: A spatial regression model for Attica region, Greece. *Trop Med Infect Dis.* 2018;3(3).
5. SEPLAN. Atlas multireferencial. Secretaria de Planejamento e Coordenação Geral. IBGE F, editor. 1990.

6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE 2015 [Internet]. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ms/tres-lagoas/panorama>
7. Reis JC. Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária. 1st ed. Olinda; 2003.
8. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1966;8(5):227–35.
9. Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Brazilian J Vet Res Anim Sci*. 2009;46(3):181–7.
10. Bio-ManguinhosA. TR DPP Leishmaniose Visceral Canina. Teste rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*. Rio de Janeiro; 2011.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª edição, 5ª reimpressão. Brasília, 2014. [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral\\_1edicao.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf)
12. Bio-ManguinhosB. EIE - Leishmaniose Visceral Canina. Ensaio Imunoenzimático para diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Rio de Janeiro; 2011.
13. Braga ARC, Langoni H, Lucheis SB. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014;20(1):1–7.
14. El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(5):575–9.
15. Eloy LJ, Lucheis SB. Hemoculture and Polymerase Chain Reaction Using Primers TCZ1/TCZ2 for the Diagnosis of Canine and Feline Trypanosomiasis. *ISRN Vet Sci*. 2012;2012:419378.
16. Ikonopoulou J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol*. 2003 Apr;113(2):99–113.
17. Oliveira TMFS, Vasconcelos EJR, Nakaghi ACH, Defina TPQ, Jusi MMG, Baldani CD, Cruz KC, Machado RZ. A novel A2 allele Found in *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. *Rev Bras de Parasitol*. Jaboticabal. 2011;20(1):42-8.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Abordagens espaciais em saúde pública. Secretaria Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.136p

- (Série B. Textos Básicos de Saúde) (Série Capacitação e Atualização em Geoprocessamento em Saúde;1).
19. Instituto Nacional de Pesquisa Espaciais. INPE. Manual do Terra View 4.2. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. São Paulo: INPE, 2004. [Internet]. 2004. Available from: [.inpe.br/terraview/php/docs.php?body=Tutorial\\_i](http://www.inpe.br/terraview/php/docs.php?body=Tutorial_i)
  20. Campos R, Santos M, Tunon G, Cunha L, et al. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. *Geospatial Health*, volume 12:503. 2017.
  21. Marcondes M, Rossi CN. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brazilian J Vet Res Anim Sci*. 29;50(5):341. 2014. Available from: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/79913>
  22. Lopes JV, Michalsky EM, Michalsky NCL et al. Canine visceral leishmaniasis in area with recent *Leishmania* transmission: prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*. Vol.:53:(e20200141): 2020. doi: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0141-2020>
  23. Figueiredo FB, Vasconcelos TCB, Madeira MF, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762018001100303&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018001100303&lng=en&tlng=en).
  24. Oliveira ALL, Paniago AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, et al. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 39(5):446–50. 2006. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822006000500005&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000500005&lng=pt&tlng=pt).
  25. Brito VN, Dias AFLR, Sousa VRF. Epidemiological aspects of Leishmaniasis in the Pantanal region of Mato Grosso. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, v. 28, n. 4, p. 744-749. 2019. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019061>
  26. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde D de VE. Guia de vigilância em saúde. Brasília. 2017.
  27. Botelho ACA, Natal D. First epidemiological description of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 42(5):503–8. 2009.
  28. Prestes-Carneiro LE, Daniel LAF, Almeida LC, D’Andrea LZ, Vieira AG, Anjolete IR, et al. Spatiotemporal analysis and environmental risk factors of visceral leishmaniasis in an urban setting in Sao Paulo State, Brazil. *Parasit Vectors*. 2019 May;12(1):251.
  29. Carvalho MR, Dias AFLR, Almeida ABPF, Alves MR, Paes AS, Sousa VRF. Canine visceral leishmaniasis: perception, prevalence, and spatial distribution in municipality of

Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso, Brazil. Braz J Vet Parsitol 2020; 29(2): e021019. 2020. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020017>

30. Oliveira AM, López RVM, Dibo MR, Rodas LAC, Guirado MM, Chiaravalloti-Neto F. Dispersion of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil: identification of associated factors through survival analysis. Parasit Vectors. 11(1):503. 2018.
31. Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, Sampaio DP, Badaro R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 59(1):53-7. 1998.
32. Ferreira CGX, Oliveira MD, Suguimoto F, Souza RF, et al. Retrospective evaluation of American Tegumentary Leishmaniosis confirmed cases in Três Lagoas - MS in the period 2007 to 2019. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.2, p. 13535-13550. 2021. doi: 10.34117/bjdv7n2-121

**Recebido em: 16/08/2021**

**Aceito em: 22/12/2021**