



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

MARIA ANGELINA DA SILVA ZUQUE

**Participação de gambás e cães domiciliados como
reservatórios de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*
georreferenciados nos municípios da Regional de Saúde de
Três Lagoas - MS**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa.Dra. Simone Baldini Lucheis



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

MARIA ANGELINA DA SILVA ZUQUE

**Participação de gambás e cães domiciliados como
reservatórios de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*
georreferenciados nos municípios da Regional de Saúde de
Três Lagoas - MS**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Doenças Tropicais

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Simone Baldini Lucheis

Botucatu

2016

Ficha catalográfica

Zuque, Maria Angelina da Silva

Participação de gambás e cães domiciliados como reservatórios de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* georreferenciados nos municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas - MS.

Maria Angelina da Silva Zuque. - Botucatu: [s.n.]. 2015

Tese - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientadora: Simone Baldini Lucheis

1. Leishmaniose Visceral. 2. Cães. 3. Gambás. 4. Infecção natural.

Palavras-chave: Leishmaniose. Doença de Chagas. Reservatório. Infecção natural.

Maria Angelina da Silva Zuque

Participação de gambás e cães domiciliados como reservatórios de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* georreferenciados nos municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas – MS.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dr^a. Simone Baldini Lucheis

Comissão examinadora

Prof. Dr^a. Simone Lucheis
Laboratório de Sanidade Animal da Agência Paulista de
Tecnologia dos Agronegócios APTA
Regional Centro Oeste - Bauru

Prof. Dr. Hélio Langoni
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FMVZ - UNESP - Botucatu

Prof^a. Dr^a. Katia Denise Saraiva Bresciani
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
UNESP - Araçatuba

Prof.^a Dr^a. Lilian Aparecida Colebrusco Rodas
Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN
Laboratório do Serviço da Regional de Araçatuba

Prof.^a Dr^a. Maria Stela Branquinho Beaudoin
Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN - SES/SP

Botucatu, 19 de fevereiro de 2016

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus...

Aos meus familiares e amigos pelo amor carinho, apoio incondicional, incentivo constante, que compreenderam minha ausência em várias ocasiões nesta etapa da minha vida.

Agradeço também pelos momentos difíceis, pois são eles que nos tornam mais fortes para enfrentar os obstáculos.

A minha orientadora, Dra. Simone Baldini Luccheis, pela amizade, força de que tudo daria certo. Serei eternamente grata pelos ensinamentos, incentivo e competência dedicados à condução desse trabalho.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

O saber se aprende com os mestres.

A sabedoria, só com o corriqueiro da vida.

Cora Coralina

Epígrafe

Zuque, MAS. **Participação de gambás e cães domiciliados como reservatórios de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* georreferenciados nos municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas – MS.** 114f Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral e a Doença de Chagas são importantes zoonoses negligenciadas do ponto de vista de saúde pública. Animais domésticos, como o cão, e animais silvestres, como os gambás, fazem parte do ciclo destas zoonoses como fontes de infecção para os vetores. O estudo foi realizado em cinco municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, em 2013 e 2014, com objetivo de identificar a ocorrência da infecção natural por *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* em gambás (*Didelphis albiventris*) e cães domiciliados, descrever aspectos epidemiológicos dessas doenças na população canina e humana, seus vetores, e a distribuição espacial da Leishmaniose Visceral Canina usando técnicas do georrefenciamento. Amostras de sangue dos cães foram submetidas a análises sorológicas e moleculares, e a dos gambás somente as análises moleculares. Em relação à pesquisa de anticorpos contra a *Leishmania* spp., as provas sorológicas de 683 amostras dos cães, revelaram reagentes 320 amostras ao Dual Path Platform, 300 amostras ao Enzyme Linked Immunosorbent Assay e 116 a Reação de Imunofluorescência Indireta. Para *Trypanosoma cruzi*, pela Reação de Imunofluorescência Indireta, quatro amostras do município de Três Lagoas foram reagentes. Das 683 amostras de sangue total, dos cães submetidas à Reação em Cadeia pela Polimerase, todas foram negativas para *Trypanosoma cruzi* e obteve-se êxito na amplificação de *Leishmania* spp em 17 amostras. As 39 amostras de sangue total dos gambás foram negativas à Reação em Cadeia pela Polimerase para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*. Na área do estudo foi confirmada a infecção natural por *Leishmania* spp. somente nos cães domiciliados, mas não foi confirmada à infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em gambás e cães domiciliados. Os casos humanos de leishmaniose persistem em algumas áreas de um município desta regional e ocorrem de forma esporádica em outros três, e um município não apresenta caso autóctone. O uso do georreferenciamento para Leishmaniose Visceral 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, e às condições ambientais são favoráveis à sua disseminação, bem como a transmissão da doença aos cães e a humanos.

Palavras chave: Leishmaniose. Doença de Chagas. Reservatório. Infecção natural.

Zuque, MAS. **Natural infection by *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and domiciliated dogs, and georeferenced from municipalities of Regional Health from Três Lagoas – MS.** 114f Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) and Chagas disease (CD) are important neglected zoonoses in accordance with public health. Domestic animals such as dogs and wildlife such as possums , are part of these zoonoses cycles as reservoirs and sources of infection for vectors. The study was conducted in five Regional Health of the municipalities of Três Lagoas , Mato Grosso do Sul in 2013 and 2014 , in order to verify the occurrence of natural infection with *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in opossums (*Didelphis albiventris*) and the pet dogs, and describe the characteristics of diseases in human and canine population , vectors , and the spatial distribution of canine Visceral Leishmaniasis using techniques georrefenciamento. In dog's blood there were performed serological analysis and molecular tests and the samples of the opossums were performed molecular tests. Regarding the research for *Leishmania* antibodies the techniques serological to 683 dog samples, showed reagent 320 samples to Dual Path Platform, 300 samples to Enzyme Linked Immunosorbent Assay and 116 to Immunofluorescence Antibody Test. For *Trypanosoma cruzi*, the test Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) four samples of Três Lagoas municipality were reactive. Of the samples from dogs 683 submitted to the Polymerase Chain Reaction were all negative by *Trypanosoma cruzi* gave successful amplification *Leishmania* spp in 17 of them. The 39 samples of the opossums were all negative by PCR to *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. In the study area was confirmed natural infection with *Leishmania* spp. only in pet dogs, but it was not confirmed to natural infection by *Trypanosoma cruzi* in opossums and pet dogs. Human cases of leishmaniasis persist in some areas of a municipality of this regional and occur sporadically in other three, and a municipality has no case. The use of georeferencing for Canine Visceral Leishmaniasis in Três Lagoas allowed to identify characteristic of the disease, as well areas with intervention priority to control the disease. The presence of phlebotomines, plus the favorable environmental conditions to its dissemination, allows the transmission of the disease to dogs and humans.

Key-words: Leishmaniasis. Chagas disease. Reservoir. Natural infection.

Lista de Mapas

Mapa 1: Localização da área do estudo, no estado de Mato Grosso do Sul. Brasil.....	27
Mapa 2: Municípios de abrangência da Regional de Saúde de Três Lagoas – MS.....	28
Mapa 3: Localização de Água Clara-MS.....	29
Mapa 4: Localização de Bataguassu-MS.....	30
Mapa 5: Localização de Brasilândia-MS.....	31
Mapa 6: Localização de Selvíria-MS.....	32
Mapa 7: Localização de Três Lagoas-MS.....	33
Mapa 8: Localização, malha urbana e regionais, segundo a Secretaria Municipal de Planejamento. Três Lagoas - MS em 2013.....	32
Mapa 9: Mapa 9: Localização das áreas I (São Carlos) e II (Vila Piloto) do inquérito sorológico canino. Três Lagoas. 2013-2014.....	41
Mapa 10: Proporção dos domicílios sem abastecimento de água do sistema de distribuição. Três Lagoas - MS. 2010.....	78
Mapa 11: Proporção de pessoas com menos de 11 anos de idade em Três Lagoas. 2010.....	79
Mapa 12: Proporção de pessoas com rendimento de até um salário mínimo em Três Lagoas. 2010.....	80
Mapa 13: Densidade de cães pelo censo canino e casos de LVC. Três Lagoas. 2013.....	82
Mapa 14: Densidade de cães pelo censo canino e casos de LVC. Três Lagoas. 2014.....	83
Mapa 15: Densidade dos casos de LVC em Três Lagoas. 2013.....	85
Mapa 16: Densidade dos casos de LVC em Três Lagoas.2014.....	86
Mapa 17: Casos de LVH, e LVC segundo exame reagente e ou sinais clínicos da doença. Três Lagoas. 2013.....	88
Mapa 18: Casos de LVH, e LVC segundo exame reagente ou sinais clínicos da doença. Três Lagoas. 2014.....	89
Mapa 19: <i>Cluster</i> para a prevalência de LVC. 2013.....	91
Mapa 20: <i>Cluster</i> para a prevalência de LVC. Três Lagoas. 2014.....	92
Mapa 21: <i>Cluster</i> para a incidência de LVC. Três Lagoas. 2013.....	94
Mapa 22: <i>Cluster</i> para a incidência de LVC. Três Lagoas. 2014.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática do ciclo biológico da <i>L. infantum</i>	17
Figura 2:	Representação esquemática do ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	23
Figura 3:	Área urbana do município de Água Clara, em destaque a rodovia BR 262. Mato Grosso do Sul. 2014.....	30
Figura 4:	Área urbana do município de Bataguassu – MS, em destaque a rodovia BR 267. 2014.....	31
Figura 5:	Área urbana do município de Brasilândia-MS.....	32
Figura 6:	Área urbana do município de Selvíria-MS.....	33
Figura 7:	Área urbana do município de Três Lagoas-MS.....	34
Figura 8:	Armadilha tipo gaiola usada para captura de gambás.....	39
Figura 9:	Coleta de amostras de sangue de gambás (<i>Didelphis albiventris</i>).....	40
Figura 10:	Coleta e acondicionamento de amostras de sangue de cães, procedentes de Três Lagoas (MS) durante o inquérito epidemiológico para Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	42
Figura 11:	Resultado reagente e não reagente do teste para Leishmaniose Visceral Canina (LVC), Dual Path Platform (DPP®).....	44
Figura 12:	Teste ELISA para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em microplacas para leitura em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.....	45
Figura 13:	Diagnóstico de LVC pelas técnicas sorológicas. Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.....	52
Figura 14:	Diagrama dos resultados reagentes nos testes sorológicos DPP®, ELISA e RIFI.....	54
Figura 15:	Diagnóstico sorológico de LVC pelas técnicas de DPP® e ELISA. Municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.....	55
Figura 16:	Número de casos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH), dos municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas (MS). 2000 a 2014.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	População estimada de cinco municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas (MS) em 2013, 2014 e 2015.....	29
Tabela 2:	Diagnóstico de LVC pelas técnicas sorológicas moleculares para <i>Leishmania</i> spp. dos municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas 2013-2014.....	50
Tabela 3:	Diagnóstico de LVC pelas técnicas sorológicas. Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.....	51
Tabela 4:	Comparação entre o teste ELISA e DPP®. Três Lagoas. MS. 2013-2014.....	53
Tabela 5:	Comparação entre o teste RIFI e DPP®. Três Lagoas. MS. 2013-2014.....	53
Tabela 6:	Comparação entre o teste RIFI e ELISA. Três Lagoas. MS. 2013-2014.....	53
	Tabela 4: Diagnóstico sorológico de LVC pelas técnicas de DPP® e ELISA. Municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.....	49
Tabela 5:	Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania</i> spp. e <i>T.cruzi</i> em cães de municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas (MS). 2013-2014.....	53
Tabela 6:	Resultados sorológicos de LVC pelas técnicas sorológicas. Municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.....	54
Tabela 7:	Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania</i> spp. e <i>T.cruzi</i> em cães de municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas (MS). 2013-2014.....	57
Tabela 8:	Resultados sorológicos de LVC pelas técnicas sorológicas. Municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.....	58
Tabela 9:	Número, percentual, incidência e letalidade de Leishmaniose Visceral Humana (LVH), segundo os municípios pertencentes à Regional de Saúde de Três Lagoas (MS). 2013 e 2014.....	64
Tabela 10:	Número de casos de LVH segundo o bairro de residência. Três Lagoas. 2013 e 2014.....	65
Tabela 11:	Número de casos de LVH segundo a faixa etária. Três Lagoas. 2013 e 2014.....	65
Tabela 12:	Número de cães eutanasiados dos municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas em 2013 e 2014.....	69
Tabela 13:	Número de <i>L. longipalpis</i> capturados no município de Três Lagoas. segundo o bairro. 2013-2014.....	74
Tabela 14:	Prevalência de Leishmaniose Visceral Canina (LVC), segundo os bairros. Três Lagoas (MS). 2013 e 2014.....	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL	16
2.2 DOENÇA DE CHAGAS	21
2.3 GEORREFERENCIAMENTO	23
3 OBJETIVOS	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Delineamento do estudo	27
4.2 Área do estudo	28
4.3 Aspectos éticos	36
4.4 Procedimentos do estudo	36
4.4.1 Determinação do tamanho amostral	36
4.4.2 Coleta de dados	37
4.4.3 Análise Estatística	37
4.5 Coleta de sangue de cães e gambás	38
4.6 Análises sorológicas	42
4.6.1 Reação de Imunofluorescência Indireta para <i>Leishmania</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
4.6.2 Dual Path Platform	43
4.6.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay	44
4.7 Análises moleculares	45
4.7.1 Reação em Cadeia pela Polimerase para <i>Leishmania</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
4.7.2 Reação em Cadeia pela Polimerase para <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
4.8 Georreferenciamento	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Resultados laboratoriais	50
5.2 Leishmaniose Visceral	62
5.3 Doença de Chagas	70
5.4 Dados entomológicos	73
5.5 Georreferenciamento	76
6 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) e a Doença de Chagas (DC) são doenças infecciosas crônicas, e os agentes etiológicos são respectivamente, *Leishmania infantum* (*L. infantum*) e *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).¹⁻³ Estas são enfermidades negligenciadas e importantes problemas de saúde pública no país, com maior carga em populações pobres e com dificuldades em acessar os serviços e ações de saúde; com baixa prioridade para desenvolvimento e acesso aos medicamentos, métodos diagnósticos e métodos de controle; assim como pouco interesse político nos níveis de gestão.⁴

No Brasil, a LV destaca-se entre as doenças emergentes e o Ministério da Saúde estima cerca de três mil pessoas infectadas anualmente. Entre 2000 e 2011 ocorreram mais de 2,7 mil óbitos. No mundo, segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), quase dois milhões de novos casos de leishmaniose são registrados por ano com 20 a 40 mil óbitos.⁴

Os canídeos estão expostos a um conjunto de agentes patogênicos que podem provocar doenças transmitidas por vetores. Em locais onde a LV é endêmica, os cães domésticos representam o principal reservatório no ciclo urbano de transmissão pelo qual, o homem e outros cães podem se infectar devido ao grande número de animais infectados e ao intenso parasitismo neles⁵⁻⁹. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem.¹⁰

Os problemas relacionados à LV se devem ao crescente número de casos em áreas endêmicas, à reemergência, à expansão para áreas indenes e à associação da doença a um processo de urbanização com maior número de indivíduos expostos.^{1,2,9}

No Brasil, os vetores relacionados com a transmissão da doença são duas espécies de flebotomíneos: *Lutzomyia longipalpis*, a principal; e *Lutzomyia cruzi*, em áreas específicas dos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.¹⁰

Por outro lado, a DC apesar do centenário de sua descrição e dos avanços realizados no seu combate, principalmente em relação ao controle do vetor, ainda é endêmica na América Latina, afetando de 16 a 18 milhões de pessoas, e estima-se que 14 mil mortes ocorrem anualmente pela doença.^{11,12}

Em relação a DC, no Brasil, predomina os casos crônicos da doença decorrentes de infecções adquiridas no passado, à maioria infectada pela via vetorial, forma de transmissão associada às baixas condições sócio-econômicas da população. O perfil epidemiológico da doença apresenta um novo cenário com a ocorrência de casos e surtos na Amazônia Legal por transmissão oral e vetorial (sem colonização e extradomiciliar). A estimativa de infectados no país é de aproximadamente três milhões de pessoas incluindo outras formas de transmissão como transfusão sanguínea, acidente em laboratório, transplante de órgão, via congênita ou oral.¹¹⁻¹⁴

Quanto às principais formas prováveis de transmissão ocorridas no país, nos últimos anos, 64% foram por transmissão oral, 10% por transmissão vetorial e em 13% não foi identificada a forma de transmissão.¹⁰ Sendo a via oral, o tipo de transmissão geralmente associada aos surtos de Doença de Chagas Aguda (DCA). Esta forma de transmissão é de grande importância epidemiológica, tendo em vista o grande número de casos, principalmente na região norte do país, sendo o processamento de açaí e outros alimentos o principal foco de contágio. Também pode ocorrer por meio da ingestão de carne crua ou mal cozida de caça ou alimentos contaminados pela secreção das glândulas anais de marsupiais infectados.^{10,15,16}

Na DC tem sido detectado *T. cruzi* em mamíferos domésticos e silvestres, portanto considerados importantes reservatórios e colaboradores na transmissão da doença, sendo os cães descritos como os mais importantes¹⁵⁻¹⁷. Na Argentina, encontraram a prevalência de 41% em cães e 42% em gatos¹⁸. Os vetores da DC são insetos da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae).¹⁰

As técnicas de geoprocessamento são ferramentas importantes de análise das relações entre o ambiente e eventos relacionados à saúde, 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.¹⁹ Estas técnicas vêm sendo utilizadas na monitorização e avaliação das ações de saúde, e permite identificar diferentes padrões de distribuição espacial, contribuindo para um melhor planejamento da saúde pública.

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 à expansão da área urbana e o aumento da população em cinco municípios desta regional, Água Clara, Bataguassu, Brasilândia, Selvíria e Três Lagoas.

Novos loteamentos surgem na periferia destes municípios, e existe a presença de um número significativo de animais domésticos nas residências, principalmente o cão. Também tem sido relatada presença de animais silvestres, como os gambás, em alguns bairros. Estes animais são importantes fontes de infecção para as espécies domésticas e para humanos, podendo ser reservatórios e portadores de zoonoses, dentre elas a LV e DC¹⁰. Segundo o Ministério da Saúde, Mato Grosso do Sul, não é considerado endêmico para DC, e não existe sobreposição dessas doenças nestes municípios.

O ambiente desempenha um importante papel na dinâmica de transmissão da doença. O desmatamento é um fator preponderante, por reduzir a disponibilidade de fonte alimentar para os flebotomíneos, 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.^{2,10,20}

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

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

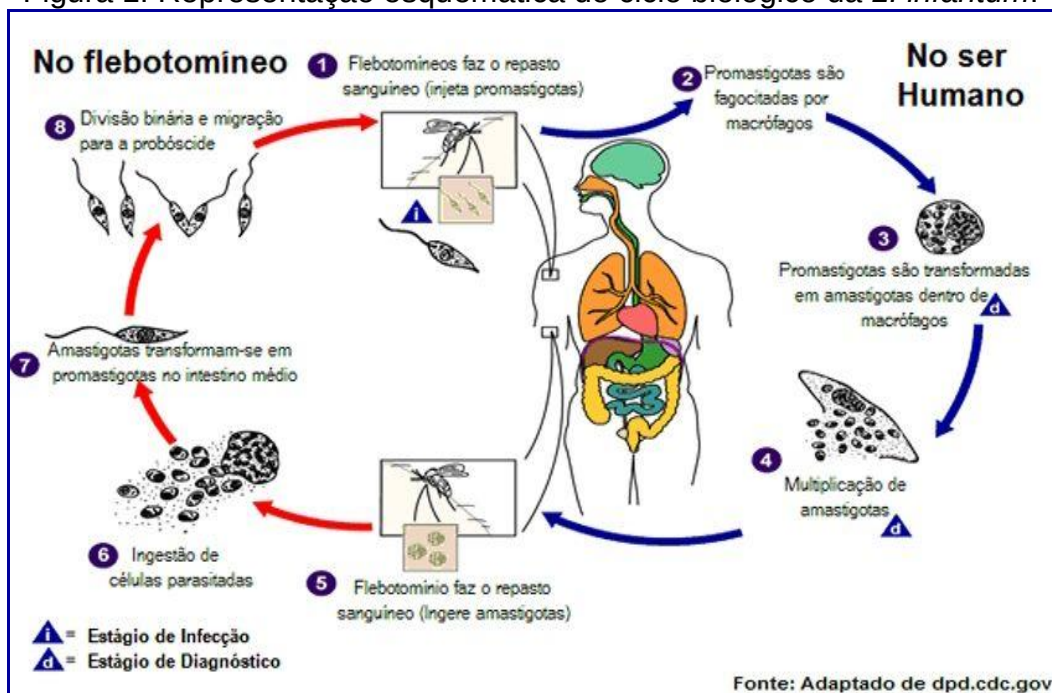
A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma antroponose causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, e agrupa espécies de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae.^{2,10,21} Nas Américas, a espécie *L. infantum* é a principal envolvida na doença visceral humana e canina.¹⁰

Esta enfermidade possui ciclo biológico heteroxeno, pois apresenta necessidade de relacionamento com dois tipos de hospedeiros, um invertebrado (dípteros hematófagos da família Psychodidae) e um vertebrado (canídeos, marsupiais, roedores ou humanos) para realizar o seu ciclo biológico.^{2,10,22} O protozoário apresenta duas formas distintas: a promastigota, flagelada do parasito, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, que é a forma infectante; e a forma amastigota, imóvel que se multiplica no interior das células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado.^{2,22}

A transmissão natural da *Leishmania* spp ocorre por meio da picada de um inseto infectado (flebotomíneo), que inocula formas promastigotas do parasito na pele do hospedeiro vertebrado no momento do repasto sanguíneo. As formas infectantes são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, na derme do hospedeiro, no interior de compartimentos fagolisossomais e se diferenciam em formas amastigotas, que se multiplicam intensamente por divisão binária. Os macrófagos repletos de parasitos, se rompem, liberando as formas amastigotas, que se propagam para as células não infectadas^{2,22} (Figura 1).

Os protozoários parasitam o baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos de mamíferos infectados, produzindo uma doença sistêmica, de início insidioso e curso crônico, com formas subclínicas, moderadas e graves. Estas últimas podem alcançar letalidade de até 90% quando não se institui terapêutica adequada e oportuna.^{10,22-25}

Figura 1: Representação esquemática do ciclo biológico da *L. infantum*.



Fonte: parasitandonaweb.xpg.uol.com.br

De acordo com a evolução clínica da LV podem ocorrer três períodos: o inicial, de estado e o final. O inicial, ou fase aguda, é caracterizado pelo início da sintomatologia, e a maioria dos casos apresenta febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. Em regiões endêmicas, uma pequena parcela de indivíduos, comumente crianças, pode apresentar quadro clínico discreto e evoluir para cura espontânea (oligossintomática). No período de estado, ocorre febre irregular, geralmente associada ao emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. Quando não é realizado o diagnóstico precoce, para início da terapêutica, a patologia avança progressivamente para o período final, com febre contínua e comprometimento do estado geral, instala-se a desnutrição, edema de membros inferiores, além de hemorragias, icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito, geralmente decorre por infecções bacterianas e/ou sangramentos.^{2,10,22}

A co-infecção entre *Leishmania*/HIV complica ainda mais o quadro do indivíduo doente, por acelerar a progressão de ambas as doenças e aumentar o risco de morte²⁶. Também, aumenta de 100-2.320 vezes o risco de desenvolver a LV em áreas endêmicas, e diminui a probabilidade da resposta

terapêutica e aumenta o risco de recidiva. Na ausência de Terapia Anti-Retroviral Altamente Ativa (TARV) o índice de recidiva após o tratamento se aproxima de 100%.^{26,27}

Tanto na infecção humana, quanto na canina, o período de incubação da doença é variável, de três meses até vários anos. No homem pode ser de 10 dias a 24 meses, com média entre 2 a 6 meses. No cão, de 3 meses a vários anos com média de 3 a 7 meses.^{10,21} Essa infecção, invariavelmente, evolui para os estados latentes ou patentes que, por sua vez, em períodos variáveis de semanas, meses ou anos, podem evoluir para as formas agudas, subagudas, crônicas ou regressivas.^{21,28}

Apesar da infecção por *Leishmania infantum* causar, predominantemente, a forma visceral, pode produzir também Leishmaniose Cutânea Atípica (LCA), que são nódulos ou placas localizadas que se assemelham ao espectro clínico de lesões cutâneas causadas por espécies dermatrópicas. A LCA pode acometer crianças maiores de cinco anos e adultos de países endêmicos para LV, principalmente na Bacia do Mediterrâneo, sendo a causa mais freqüente da leishmaniose cutânea no Sul da Europa e, na América Central.²⁹⁻³¹

No Brasil, são responsáveis pela transmissão da doença, as fêmeas de dípteros pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, do gênero *Lutzomyia*, sendo a principal espécie envolvida a *L. longipalpis*.^{2,10} Em Corumbá, Mato Grosso do Sul, onde a *L. longipalpis* não está presente, foi incriminada como vetora, outra espécie a *Lutzomyia cruzi*.^{10,21}

O ciclo biológico da *L. longipalpis* se processa no ambiente terrestre, próximos a vegetação em raízes e/ou troncos de árvores, úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa, sem vento e que tenham alimento por perto.^{1,22,32-34} Compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto. O desenvolvimento do ovo ao inseto adulto decorre um período de aproximadamente 30 a 40 dias de acordo com a temperatura. Os ovos eclodem geralmente de 7 a 10 dias após a postura. As larvas desenvolvem-se em média entre 20 a 30 dias e, em condições adversas, as larvas de quarto estágio podem entrar em diapausa, parada do desenvolvimento, que possibilita a resistência até um período favorável ao seu desenvolvimento. As larvas de quarto estágio transformam-se

em pupas, mais resistentes às variações de umidade do que os ovos e as larvas. O período pupal em condições favoráveis tem duração em média de uma a duas semanas.^{22,33-35}

Na fase adulta estão adaptados a diversos ambientes, e são facilmente reconhecíveis por voarem em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas, possuem em média um raio de vôo de 250 metros. Seu tamanho varia de um a três mm de comprimento, pernas longas e delgadas, corpo coberto de pelos e de coloração clara (cor de palha ou castanho claro). Os flebotomíneos são conhecidos por diferentes denominações de acordo com a região do país, por exemplo: cangalhinha, mosquito palha, birigui e outros.^{22,33-35}

A sua atividade é crepuscular e noturna, e somente as fêmeas são hematófagas obrigatórias, requerendo o sangue para a maturação de seus ovos, daí a importância para transmissão de agentes patógenos.^{22,33-35} Ambos os sexos necessitam de carboidratos de néctares de flores, frutos e outros sucos de plantas, além de mel de afídeos ou outros homópteros para serem utilizados como fonte de energia. A ingestão de carboidratos pode afetar o desenvolvimento e a infectividade das leishmanias no seu tubo digestivo.³⁵

A *L. longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, pode ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos. Há indício de que o período de maior transmissão da LV ocorra durante e logo após a estação chuvosa, quando ocorre o aumento da densidade populacional.²² A presença e a flutuação estacional das populações de flebotomíneos, estão ligadas aos fatores climáticos, como temperatura, umidade relativa do ar, índice pluviométrico, e aos fatores fisiográficos, como composição do solo, altitude, relevo e tipo de vegetação.¹⁰

Os canídeos, especialmente os cães domésticos e errantes, são apontados como os mais importantes reservatórios natural do parasito no ambiente urbano.^{22,36} Contribuíram para a rápida expansão da doença no ambiente urbano, a fácil adaptação do vetor ao peridomicílio, a proximidade entre as habitações, a alta densidade populacional, o intenso convívio do homem com o cão, e a suscetibilidade da população à infecção.^{20,37} As condições ambientais são favoráveis ao surgimento e a manutenção de focos caninos e ou humanos de LV.^{10,22,38}

O clima em regiões endêmicas com prolongados períodos de estiagem expostas a regimes pluviométricos irregulares, desempenha um importante papel no ciclo epidêmico, porque em períodos longos de seca, ocorre redução da densidade da população vetorial, reduzindo a pressão de infecção e a incidência da LV. No período de chuvas, a densidade vetorial multiplica-se intensamente levando a um reequilíbrio dessa população.²²

Vários estudos têm demonstrado que o sexo do cão geralmente não é um fator determinante da LVC; ao contrário da idade do animal.³⁹ A prevalência da leishmaniose por faixa etária normalmente apresenta uma distribuição bimodal, com 80% dos cães infectados com idade inferior a três anos, e outro pico, menos significativo, quando os cães começam a sofrer depressão imunológica a partir dos oito a dez anos de idade.⁴⁰

Os principais reservatórios conhecidos no ambiente silvestre são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), os sariguês ou saruês e marsupiais das espécies *Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris*. O fato destes animais terem hábitos sinantrópicos pode propiciar o elo epidemiológico entre os ciclos silvestres e domésticos.^{2,37}

De acordo com o Ministério da Saúde, o controle da LV, de modo geral, encontra-se centrado no combate químico ao vetor e na redução das fontes de infecção por meio da eliminação dos cães infectados. Todas as ações são implementadas na perspectiva de interrupção do ciclo epidemiológico ou redução da força de transmissão do agente, em função da inexistência de vacina segura e eficaz para uso em populações.¹⁰

Apesar dos esforços que vêm sendo continuamente empreendidos pela rede de serviços do Sistema Único de Saúde (SUS), voltados ao controle entomológico e reservatório animal em todas as áreas afetadas do país, observa-se a descontinuidade de ações, mudanças político-administrativas, dentre outros, o que fragiliza o controle da doença. A incidência continua em ascendência, demonstrando o grau de complexidade da doença e a baixa vulnerabilidade às tecnologias disponíveis e estratégias empregadas nos programas de controle, especialmente em áreas urbanas.^{20,41}

Em relação aos casos em humanos o SUS disponibiliza tratamento gratuito, embora, a letalidade se mantém relativamente alta. Contudo, nos dias atuais, o Brasil concentra cerca de 90% dos casos de leishmaniose registrados

nas Américas²⁰, mas vale à pena ressaltar que muitos países não incluem a LV na lista de doenças de notificação compulsória o que dificulta a comparação.

2.2 DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas (DC) é uma infecção crônica causada pelo *T. cruzi*, protozoário hemoflagelado. Este parasito pertence à ordem *Kinetoplastida*, gênero *Trypanosoma* que é um dos mais importantes gêneros da família *Trypanosomatidae* por incluir uma série de espécies patogênicas para humanos e animais, a exemplo do *T. cruzi*; do *Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense*, agentes da doença do sono em humanos e dos *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma evansi* importantes na sanidade animal.³

O *T. cruzi* pertence a uma população heterogênea, composta por cepas que realizam ciclos de vida no meio doméstico e cepas que têm este ciclo na natureza, incluindo seus respectivos hospedeiros humanos, animais e vetores. Isolamentos e estudos das populações de *T. cruzi* a partir de diferentes origens demonstraram a presença de uma grande variedade de cepas com diferentes características biológicas, imunológicas, bioquímicas e farmacológicas.^{42,43}

O protozoário apresenta um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros mamíferos e insetos. Como os ambientes apresentados ao *T. cruzi* são muito diferentes em suas características físico-químicas, o parasito desenvolveu ao longo da evolução estratégias que o habilitaram a lidar com essas diferenças. Muitas características do parasito como morfologia, ciclos metabólicos, expressão diferenciada de moléculas citoplasmáticas e de superfície, capacidade de infecção, de multiplicação, entre outras, devem ser adequadas a cada novo ambiente.³⁸

Os vetores da Doença de Chagas são os triatomíneos, obrigatoriamente hematófagos em todos os estádios evolutivos, podem infectar-se por *T. cruzi* e transmiti-lo desde seu primeiro estágio.⁴⁵ Estes insetos possuem hábitos geralmente noturnos e com metamorfose parcial, vivendo em média entre um e dois anos. A maioria dos triatomíneos é encontrada em ecótopos silvestres, predominando nas regiões tropicais e neotropicais. A transmissão pode ocorrer

tanto no ambiente domiciliar como no ambiente silvestre. O inseto está associado à transmissão vetorial, como também a surtos orais.^{10,46}

A transmissão natural ao homem e outros mamíferos animais ocorre pelos hospedeiros intermediários do parasito, hemípteros hematófagos da subfamília *Triatominae*. No entanto a transmissão também pode ocorrer por transfusão de sangue, transplante de órgãos, aleitamento materno, durante a gestação, ingestão de formas parasitárias em alimentos contaminados e de forma acidental, quando ocorre por meio de outros vetores ou pelo contato direto com as fezes infectadas de triatomíneos.⁴²

No Brasil, a transmissão oral, era considerada esporádica em humanos, mas tem ocorrido com certa frequência, e esses surtos são responsáveis pelo aumento do número de novos casos da forma aguda da doença e de morbimortalidade. A maior parte dos casos foi registrado na região amazônica e associado ao consumo de açaí fresco, possivelmente contaminado pelas fezes de insetos infectados ou pelo próprio inseto infectado triturado durante o preparo. Estes surtos, comumente têm sido relacionados ao consumo de alimentos contaminados; invasão humana de habitats silvestres aumentando os riscos associados à proximidade de vetores, e à maior capacidade e disponibilidade de diagnóstico, que permite caracterizar casos e surtos. Existem relatos de transmissão oral também em outros estados.⁴⁷⁻⁴⁹

A principal forma de transmissão do parasito ocorre quando as fezes ou urina do triatomíneo, contendo formas infectantes de *T. cruzi*, tripomastigota metacíclica. Pelo reflexo de coçar dos mamíferos, estas formas acessam mais facilmente a circulação sanguínea, se aderem e invadem outras células do hospedeiro, onde se diferencia na forma amastigota, e multiplica-se por divisão binária. Em geral, amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, antes do rompimento da célula hospedeira pelo excesso de parasitos, que infectam novas células dando origem a um ciclo interno no hospedeiro. Ao ser sugado pelo vetor durante o repasto sanguíneo, vão parar na porção anterior de seu intestino, onde se diferenciam em epimastigotas podendo passar pelos estágios amastigota e esferomastigota.^{3,50,51} Quando alcançam a porção posterior, começam a multiplicar-se por divisão binária, podendo aderir-se às células intestinais. Ao chegarem à ampola retal, as epimastigotas aderem-se à cutícula serosa que recobre a parede desta região do corpo do inseto. Uma vez

completada a diferenciação, as tripomastigotas metacíclicas se soltam da cutícula, podendo ser eliminadas na urina ou fezes do inseto em seu próximo repasto sanguíneo⁵² (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática do ciclo biológico do *T. cruzi*.



Fonte: www.sociobiologia.com.br

No Brasil, os dados apontam redução das taxas de infestação residencial por triatomíneos após 20 anos de controle químico continuado, particularmente para as espécies *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*.⁵³ Esta situação é considerada instável em vista da frequente presença de triatomíneos adultos nas residências em áreas endêmicas representando risco de novas infecções e de reestabelecimento de novas colônias domésticas e peridomésticas do vetor.⁵⁴

2.3 GEORREFERENCIAMENTO

O georreferenciamento é um conjunto de tecnologias voltado para a coleta e tratamento de informações espaciais, e tem sido empregado para avaliação na área da saúde.⁵⁵ Trata-se de uma técnica aprimorada que consiste em tornar as coordenadas conhecidas num dado sistema de referência adotado pelo país. Atualmente muito difundida, devido à necessidade de se obter delimitação real de uma determinada área sem correr os riscos de sobreposição desta.⁵⁶

O geoprocessamento é uma disciplina do conhecimento que utiliza técnicas matemáticas e computacionais para o tratamento da informação

geográfica, que vem influenciando crescentemente os estudos em diversas áreas, como na Cartografia, na análise de Recursos Naturais, nos Transportes, nas Comunicações, na Energia e Planejamento Urbano e Regional, entre outros.⁵⁷

As técnicas de geoprocessamento veem sendo utilizadas no planejamento, monitoramento e avaliação das ações de saúde, além de serem consideradas como ferramentas importantes de análise das relações entre o ambiente e eventos relacionados à saúde, e pode ser utilizado na análise dinâmica de difusão espacial das doenças e suas relações com o ambiente com alta resolução gráfica, na avaliação da situação de saúde de populações e na identificação de regiões e grupos sob alto risco de adoecimento.⁵⁸

A utilização de ferramentas espaciais, como o Sistema de Informações Geográficas (SIG), permite mapear e identificar as áreas com alto risco para ocorrência de novos casos da doença. Este sistema possui a capacidade de gerenciar dados complexos, pautados no componente geográfico do território, constitui-se numa estrutura de processamento eletrônico de dados que permite a captura, armazenamento, manipulação, análise, demonstração e relatos de dados referenciados geograficamente. Quando aliada ao uso de tecnologias do geoprocessamento, tem oferecido importantes subsídios para a área da saúde, identificando fatores e condicionantes na ocorrência de uma doença, e surgem contribuições para o estudo espacial do binômio saúde-doença.^{59,60}

O SIG possui grande capacidade para acessar e integrar diferentes níveis de informações (vetoriais, de superfície e dados de campo e endereços), permite ainda a apresentação e associação dos dados de diferentes formas (tabelas, gráficos e mapas temáticos) e possibilita o mapeamento. Além disso, o sistema manipula os dados como os demais sistemas de informação e possui uma característica marcante de interligar atributos não espaciais a dados espaciais.^{60,61} As análises podem viabilizar a tomada de decisões garantindo um planejamento estratégico para a alocação de recursos e implantação de medidas de controle.

Há diversos estudos de aplicações espaciais relacionadas às leishmanioses. Em pesquisa sobre a distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no estado de Sergipe, Tavares e Tavares⁶² concluíram, através da análise espacial, que houve a expansão da enfermidade em todas as regiões

sergipanas sem existir o deslocamento dos principais focos da doença. Oliveira et al.⁶³ fizeram uma análise espacial da associação entre os casos incidentes de LVC e compararam com a incidência da LVH em Belo Horizonte. Furlan⁶⁴ analisou a evolução da epidemia no estado do Mato Grosso do Sul e Paulan⁶⁵ analisou a distribuição espacial e temporal em Ilha Solteira – SP.

O estimador de intensidade de Kernel é um teste visual de detecção de aglomerados e dispersão dos dados, que usa a distância média entre os pontos e seu desvio padrão. A sua estimativa é uma técnica estatística de interpolação, não paramétrica, exploratória que mostra o padrão de distribuição de pontos gerando uma superfície de densidade com identificação visual de áreas com maior intensidade da ocorrência de um evento onde se analisa a concentração de casos (*cluster*).⁶⁶

Estas técnicas podem ser usadas rotineiramente para gerar atividades de mapeamento, delinear a presença/ausência de vetores e reservatórios, bem como a distribuição, concentração e disseminação de casos de doenças.

3 OBJETIVOS

Objetivos gerais

O estudo foi realizado em cinco municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas, localizada no Mato Grosso do Sul, no período de 2013 e 2014, com o objetivo de identificar a ocorrência da infecção natural por *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* em gambás (*Didelphis albiventris*) e cães domiciliados, descrever aspectos epidemiológicos dessas doenças na população canina e humana, seus respectivos vetores, e realizar análise espacial da Leishmaniose Visceral Canina utilizando técnicas de georrefenciamento.

Objetivos específicos

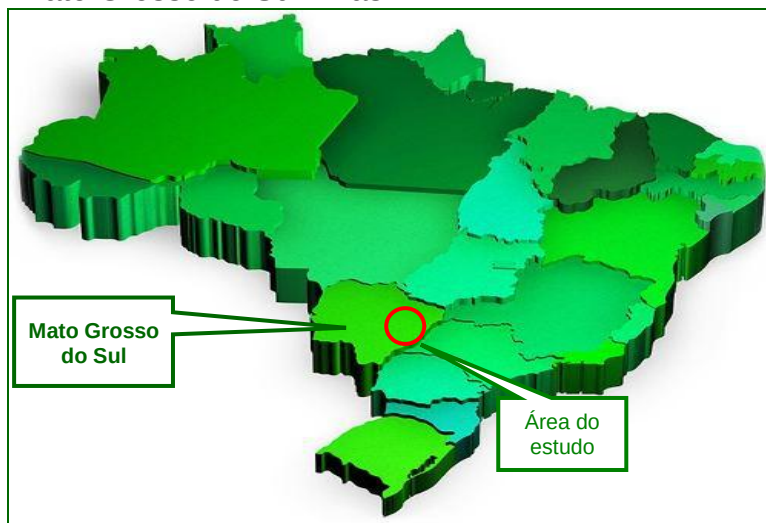
- Identificar anticorpos contra *Leishmania infantum*, em amostras de sangue canino, pelas análises sorológicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Dual Path Platform (DPP®);
- Comparar o diagnóstico sorológico das amostras caninas entre os testes de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Dual Path Platform (DPP®);
- Identificar anticorpos contra *Trypanosoma cruzi*, em amostras de sangue canino, pela análise sorológica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI);
- Pesquisar *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em amostras de sangue de gambás (*Didelphis albiventris*) e canino pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal, descritivo realizado em cinco municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas, situados na região leste do Estado de Mato Grosso do Sul, localizado na região Centro-Oeste do Brasil⁶⁷, (Mapa 1). O período analisado foram os anos de 2013 e 2014.

Mapa 1: Localização da área do estudo, no estado de Mato Grosso do Sul. Brasil



Fonte: Mapas Garmin

Para a realização do estudo, os dados dos casos humanos das duas enfermidades, 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. Já os dados sobre a LVC foram coletados no Centro de Controle de Zoonoses de Três Lagoas (CCZ/TL).

As provas sorológicas para diagnóstico de LVC das amostras de sangue dos cães para o estudo foram realizadas no CCZ/TL, de acordo com o protocolo do Ministério da Saúde, sendo para triagem o teste rápido Dual Path Platform (DPP®), e para confirmação o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Os procedimentos laboratoriais de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum* e *T. cruzi* das amostras de sangue canino, bem

como as provas moleculares de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de amostras de sangue total de cães e gambás foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA/SAA) - Polo Centro-Oeste, Bauru (SP).

4.2 Área do estudo

O estudo abrangeu cinco municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas localizados na região Leste do estado. São eles: Água Clara, Bataguassu, Brasilândia, Selvíria e Três Lagoas, (Mapa 2), sendo este último a referência na assistência a saúde para os demais. Com exceção de Água Clara os demais municípios fazem divisa com o estado de São Paulo. Nesta região, segundo a classificação de Köppen, ocorrem dois tipos climáticos: o de maior abrangência, AW, clima tropical úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno, e a Ca, clima mesotérmico úmido sem estiagem. A precipitação pluviométrica anual varia entre 1500 a 1750 mm anuais, com chuvas mais intensas de novembro a fevereiro, estendendo-se o período seco por cerca de quatro a cinco meses. Quanto à vegetação se localiza na região do Cerrado.⁶⁷⁻

68

Mapa 2: Municípios de abrangência da Regional de Saúde de Três Lagoas - MS



Fonte: SMS/TL

Conforme dados da Tabela 1, a população total, estimada para esses municípios em 2013, 2014 e 2015, segundo o IBGE, era de 162.803, 165.578 e 168.226 habitantes, respectivamente, sendo que a maioria residente na área urbana. Quanto à população canina, somente Três Lagoas realizou o censo canino em 2013 e registrou 20.336 cães, relação de 1 cão para cada 5,4 habitantes.

Tabela 1: População estimada de cinco municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas (MS) segundo o IBGE. 2013, 2014 e 2015.

Municípios	2013	2014	2015
Água Clara	13.938	14.210	14.474
Bataguassu	21.142	21.463	21.775
Brasilândia	11.804	11.826	11.903
Selvéria	6.287	6.427	6.455
Três Lagoas	109.632	111.652	113.619
TOTAL	162.803	165.578	168.226

Fonte: IBGE

Água Clara

O Município de Água Clara fica a 192 km da capital do Estado, Campo Grande⁶⁹ (Mapa 3).

Mapa 3: Localização do município de Água Clara - MS



Fonte: GAL/SES/MS

Localiza-se a uma latitude 20°26'53" sul a uma longitude 52°52'40" oeste. Em sua região central passa a rodovia BR 262, (Figura 3), que inicia em Vitória no estado do Espírito Santo, passa por cidades importantes como Belo Horizonte, Araxá, Uberaba, Três Lagoas e Campo Grande. Esta rodovia termina junto à fronteira com a Bolívia, em Corumbá, no Mato grosso do Sul, e interliga os estados do Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul.^{67,68}

Figura 3: Área urbana do município de Água Clara, em destaque a rodovia BR 262. Mato Grosso do Sul. 2014

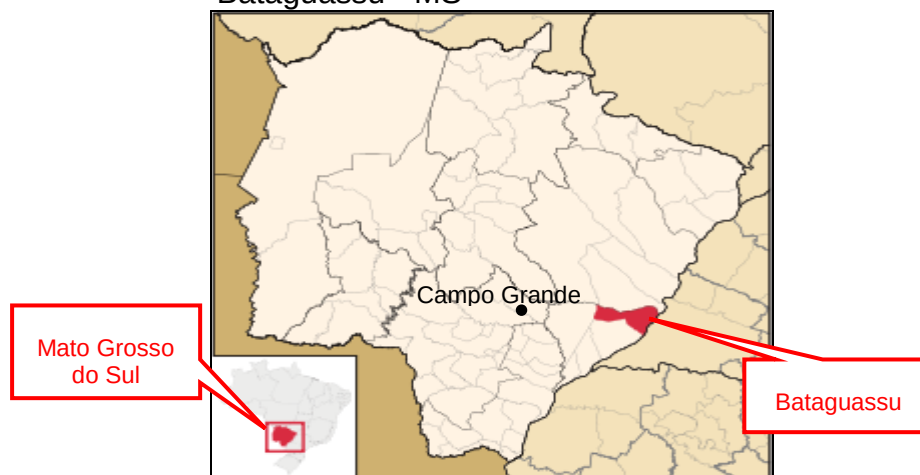


Fonte: www.perfilnews.com.br

Bataguassu

O município de Bataguassu, a sede fica a 341 km da capital, na divisa entre Mato Grosso do Sul e São Paulo⁶⁷ (Mapa 4).

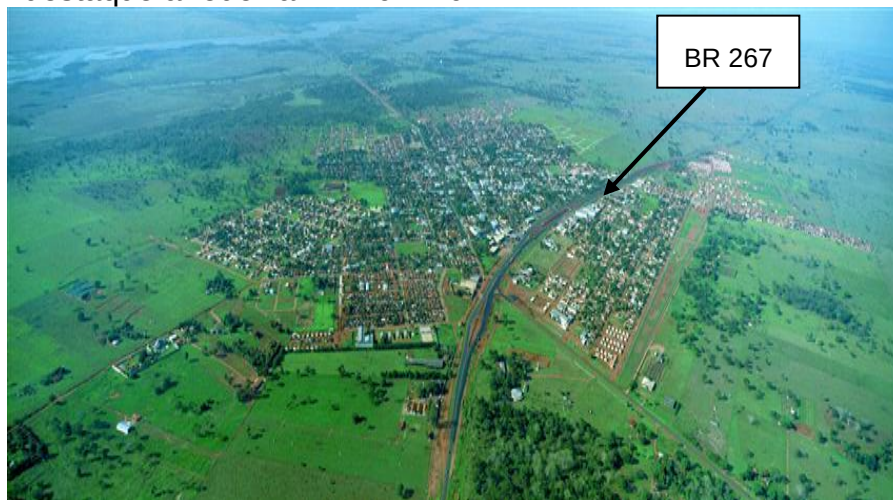
Mapa 4: Localização do município de Bataguassu - MS



Fonte: GAL/SES/MS

O município localiza-se na latitude $21^{\circ}42'51''$ sul e longitude de $52^{\circ}25'20''$ Oeste. É um importante corredor rodoviário (BR 267) de acesso aos municípios do estado e estado de São Paulo (Figura 4), promovendo a dinâmica de relações comerciais das empresas de Bataguassu, favorecendo a implantação de indústrias no estado que contribuem às exportações no MS.^{67,68}

Figura 4: Área urbana do município de Bataguassu – MS, em destaque a rodovia BR 267. 2014



Fonte: www.cmbataguassu.ms.gov.br

Brasilândia

O município de Brasilândia fica a 352 km da capital estadual, Campo Grande, e localiza-se na latitude de $21^{\circ}15'21''$ Sul e longitude de $52^{\circ}02'13''$ Oeste⁶⁷ (Mapa 5 e Figura 5).

Mapa 5: Localização do município de Brasilândia - MS



Fonte: GAL/SES/MS

Figura 5: Área urbana do município de Brasilândia. MS.2014



Fonte: dutracarlito.com

Selvória

O município de Selvória está situado no Leste do estado, localiza-se a uma latitude 20°22'02" Sul e a uma longitude 51°25'08" Oeste. Fica distante da capital 410 Km⁶⁷ (Mapa 6, Figura 6).

Mapa 6: Localização de Selvória.MS.



Fonte: GAL/SES/MS

Figura 6: Área urbana do município de Selvíria. MS. 2014

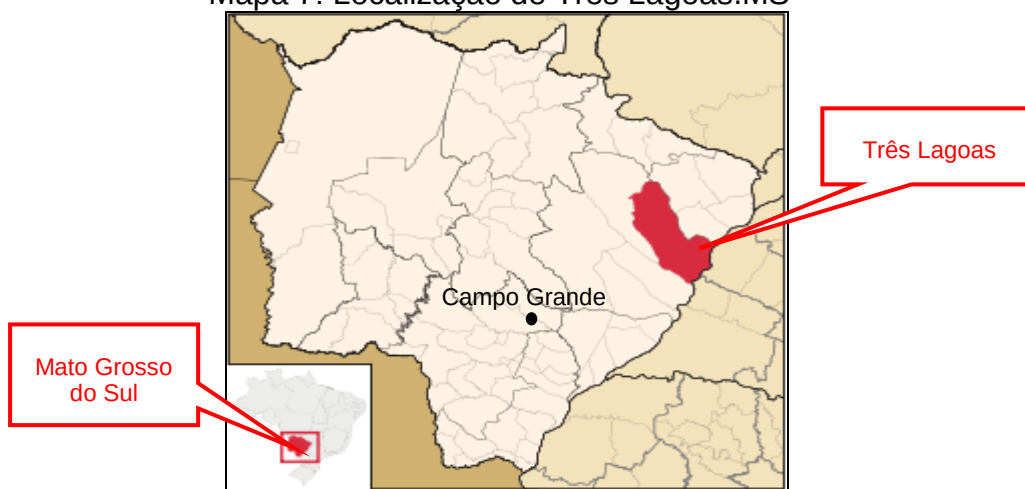


Fonte: www.diganaoaleismaniose.com.br

Três lagoas

Três Lagoas localiza-se a uma latitude de 20°45'04" Sul e longitude de 51°40'42" Oeste⁶⁷ (Mapa 7).

Mapa 7: Localização de Três Lagoas. MS



Fonte: GAL/SES/MS

Trata-se da terceira cidade mais populosa de Mato Grosso do Sul e fica a 330 Km da capital. As rodovias BR 262, BR 158 passam pelo município, além da hidrovia e ferrovia, sendo um importante pólo industrial e de escoamento para outras regiões do país^{67,68} (Figura 7).

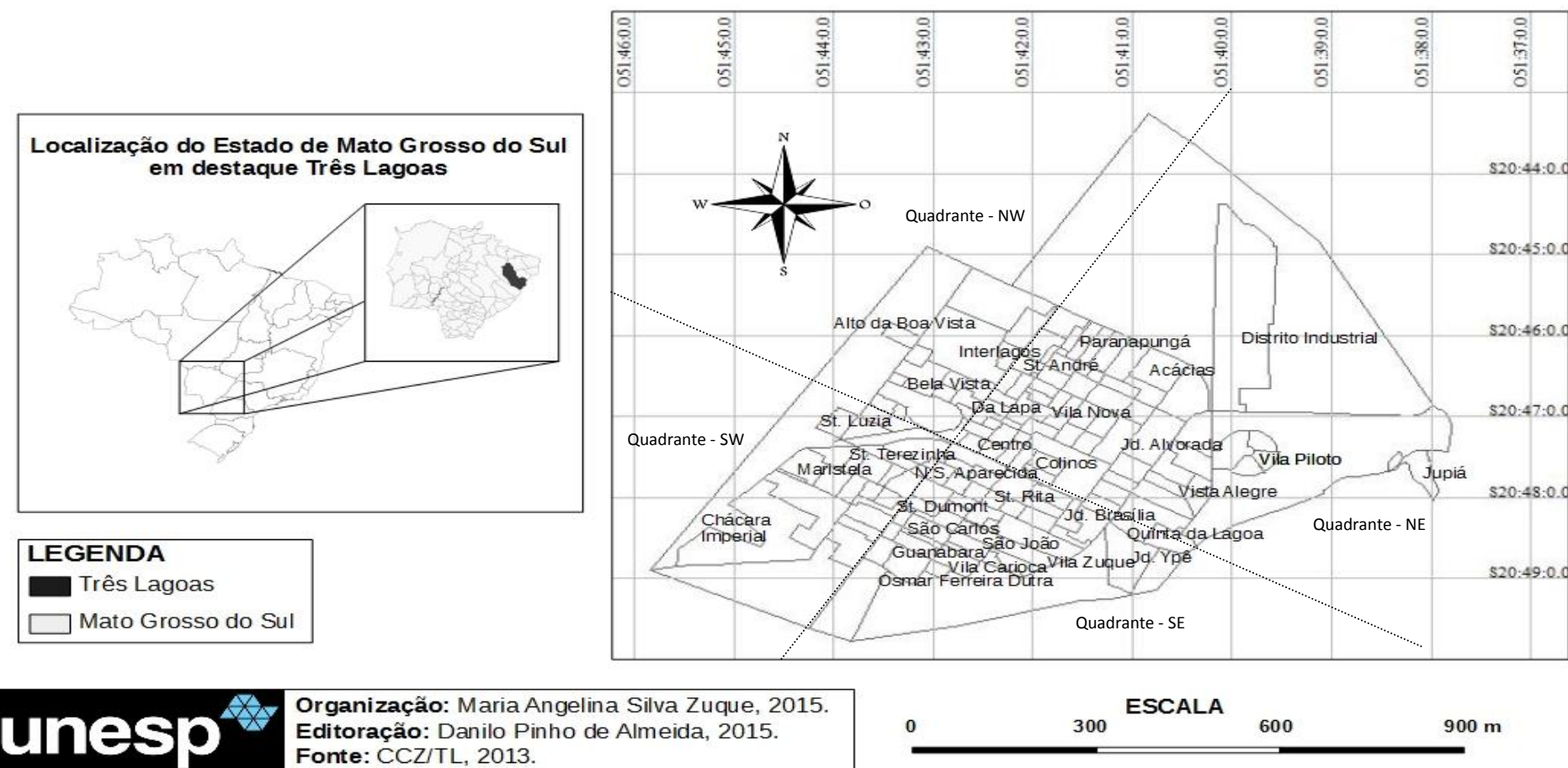
Figura 7: Área urbana do município de Três Lagoas-MS. 2014



Fonte: www.3lagoas.com.br

A área urbana de Três Lagoas, segundo a Secretaria Municipal de Planejamento, compreende quatro regionais: Nordeste e o centro da cidade, Sudeste, Sudoeste e Noroeste com 13, 10, oito bairros e quatro bairros respectivamente (Mapa 8).

Mapa 8: Localização, malha urbana e regionais, segundo a Secretaria Municipal de Planejamento. Três Lagoas - MS em 2013



4.3 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi iniciado após autorização dos órgãos competentes, Secretaria do Meio Ambiente de Três Lagoas (Anexo 1) e Centro de Controle de Zoonoses de Três Lagoas (Anexo 2), aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB/UNESP, número do parecer 476.698.

4.4 PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

4.4.1 Determinação do tamanho amostral

Para os gambás foi utilizada amostragem por conveniência.^{70,71} e foram capturados 39 animais da espécie *D. albiventris*. O cálculo do tamanho amostral dos cães para o município de Três Lagoas, considerando a população do inquérito canino (N=3197), foi realizado utilizando a fórmula:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1-p) + e^2 \cdot (N-1)}$$

Onde foi estimado um número ideal de 344 cães.

n - amostra calculada (344)

N – população (3197)

Z - variável normal padronizada associada ao nível de confiança (1,96)

p - verdadeira probabilidade do evento (50%)

e - erro amostral (0,05)

IC - Intervalo de Confiança (95%)

Apesar do cálculo ideal de 344 cães para Três Lagoas foram coletadas amostras de sangue de 566 cães, e para os demais municípios utilizou-se de amostra não probabilística de conveniência.^{70,71}

Desta forma no estudo, foi coletado o total de 683 amostras de sangue de cães que foram submetidas a testes sorológicos e moleculares, sendo assim distribuído: Água Clara (n=23), Bataguassu (n=21), Brasilândia (n=26), Selvíria (n=47) e Três lagoas (n=563).

4.4.2 Coleta de dados

Para o estudo foram coletados:

- dados secundários dos casos humanos de Leishmaniose Visceral (LVH) e Doença de Chagas (DC) do Sistema Nacional de Agravos e Notificação (SINAN) e vigilância Epidemiológica do Núcleo Regional de Saúde/TL da Secretaria Estadual de Saúde;
- dados de flebotomíneos e triatomíneos do Laboratório de Entomologia de Três Lagoas e do Núcleo Regional de Saúde da Secretaria Estadual de Saúde (NRS/TL), e colocação de armadilha luminosa (CDC) para captura de flebotomíneos em uma área verde;
- número de exames com sorologia canina (DPP e ELISA) reagente e não reagente para leishmaniose realizados em exames de rotina e no inquérito canino, e o total de casos considerados como LVC, independente da realização de sorologia (casos clínicos) do Centro de Controle de Zoonoses de Três Lagoas (CCZ/TL).
- número de exames reagente e não reagente a RIFI e a PCR realizados no Laboratório de Sanidade Animal da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA/SAA) - Polo Centro-Oeste, Bauru (SP).

4.4.3 Análise Estatística

Os dados coletados foram armazenados em Excel (© *Microsoft*), e consolidados em planilhas, tabelas, gráficos e mapas, para análise. Foi realizada análise descritiva dos dados, quanto à variável de interesse, e os resultados dos testes sorológicos foram expressos em porcentagem. Foram utilizadas taxas de incidência e prevalência para as análises epidemiológicas e para as análises dos dados utilizou-se o software Statistica 8.0.

Na comparação dos resultados dos métodos sorológicos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) com a técnica de Dual Path Platform (DPP®), para saber se há diferenças significativas nos testes, foi analisada a partir da composição da tabela de contingência, utilizando o teste estatístico Chi-Quadrado de Pearson, para a comparação de frequências de ocorrência. O teste estima as frequências que seriam esperadas ao acaso, e as compara com as frequências

observadas, munido destas informações e dos graus de liberdade da amostra, estima-se o valor de p para a análise. O cálculo do Qui-quadrado foi feito, portanto a partir da seguinte fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

A concordância nos diagnósticos sorológicos foi calculada usando-se o índice *Kappa* (k), que se define como:

$$k = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Po= proporção de concordâncias observadas

Pe= proporção de concordâncias esperadas

4.5 COLETA DE SANGUE DE CÃES E GAMBÁS

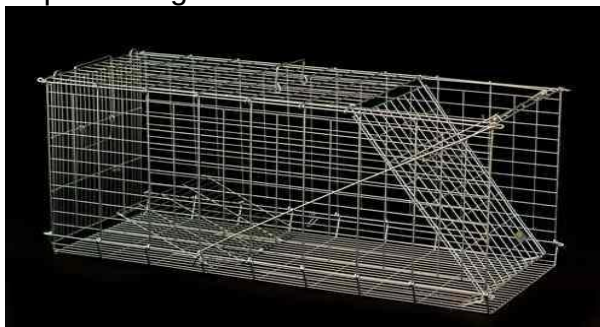
Tanto em cães como em gambás não foi objeto do estudo utilizar métodos invasivos pelo fato de não ser rotina do CCZ/TL, e não se dispor de recursos materiais.

Coleta de sangue de gambás

Os gambás foram capturados apenas do município de Três Lagoas por questões logísticas e operacionais. As amostras de sangue coletadas foram processadas por análise molecular e identificação de *L. infantum* e *T. cruzi*.

A população do município de Três Lagoas, quando se depara com a presença de gambás procura ajuda do corpo de bombeiros, da polícia ambiental ou acabam afugentando ou mesmo matando esses animais em seus domicílios, tendo em vista que não existem ações programadas no CCZ/TL para atender esta demanda o que tornou mais difícil esta parte do estudo. O Zoológico de Ilha Solteira (SP) emprestou armadilhas tipo gaiola (Figura 8), para que a captura desses animais pudessem ser realizadas.

Figura 8: Armadilha tipo gaiola usada para captura de gambás.



Fonte: Arquivo pessoal

A captura destes animais foi realizada nos domicílios quando informado da sua presença pelos moradores, e também no quartel militar do município que possui uma grande área verde em região densamente povoada.

No quartel foi solicitada ao comandante a permissão para colocação das armadilhas tipo gaiola, contendo iscas atrativas preparadas com fubá, creme de amendoim e óleo de fígado de bacalhau.⁷² Mediante o consentimento, foram instaladas dez armadilhas para a captura de gambás diariamente por uma semana no período vespertino. Elas eram retiradas pela manhã, e foram capturados oito exemplares de gambás da espécie *D. albiventris*. Neste local também foi colocado uma armadilha luminosa (CDC) para flebotomíneos, e foi capturada uma fêmea da espécie *L. longipalpis*.

Nos domicílios foram colocadas de quatro a seis armadilhas tipo gaiola por imóvel, contendo iscas atrativas, no período vespertino que foram retiradas na manhã do dia seguinte. Esta atividade durou em média três dias alternados, por imóvel. Foram capturados 31 gambás da espécie *D. albiventris*. Apesar da presença dos mesmos nos domicílios e peridomicílios, relatada pelos moradores, foram muitas tentativas infrutíferas, sendo que se deve considerar a grande oferta e diversidade de alimentos encontrados nestes locais.

Dos 39 animais capturados, foi coletado amostra de sangue total, no CCZ/TL, sob anestesia, por médico veterinário (Figura 9). Os anestésicos para esse procedimento foram em associação: Ketamina (30 mg/kg, Fort Dodge®) e Xilazina (2mg/kg, Calier®). Um volume de três a cinco mL de sangue foi coletado da veia caudal central, em tubo vacutainer contendo EDTA, para a realização da técnica de PCR. Os animais foram marcados, mantidos sob observação e posteriormente foram entregues a Polícia Ambiental para serem

liberados no ambiente silvestre. Todos os animais aparentavam estar saudáveis.

Figura 9: Coleta de amostras de sangue de gambás (*Didelphis albiventris*)



Fonte: Arquivo pessoal

Coleta de sangue de cães

As amostras de sangue dos cães domiciliados de Três Lagoas, para o estudo, foram coletadas por técnicos do CCZ/TL durante o inquérito sorológico canino. O contentor do animal foi o proprietário do mesmo, e se necessário usou-se cambão e focinheira.

O inquérito 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 (Mapa 9).

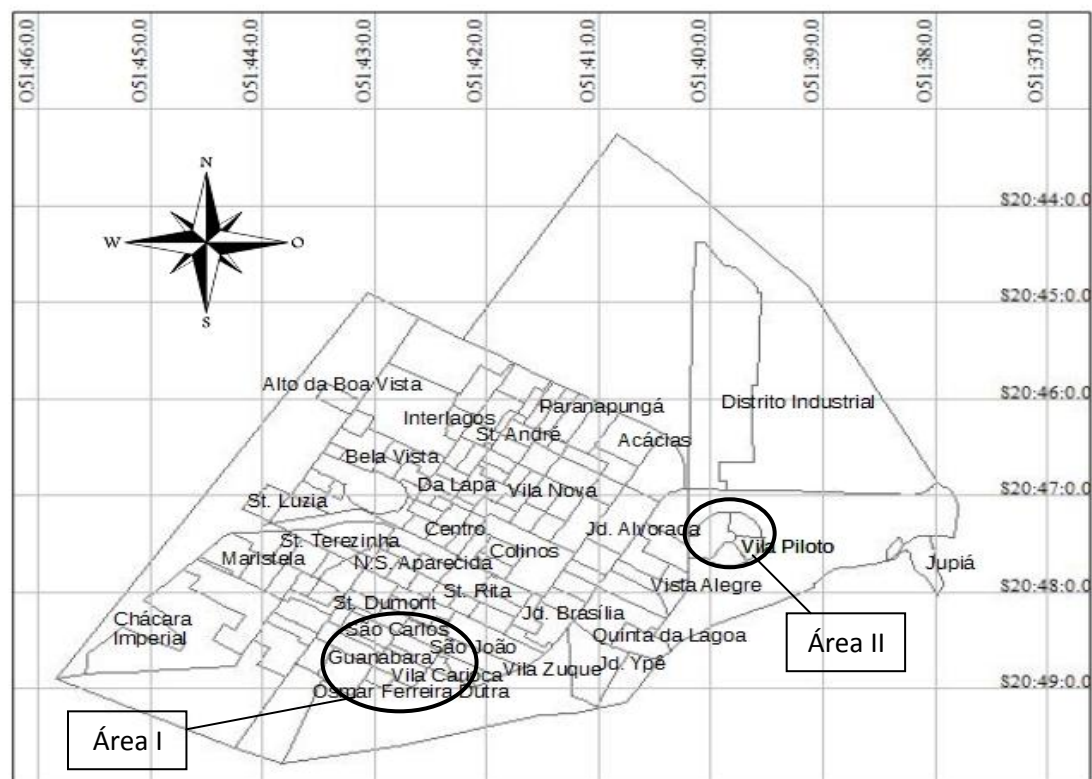
As coletas de sangue dos cães de Selvíria foram realizadas pela médica veterinária do município, e eram dos animais participantes de um projeto de encoleiramento com a coleira Scalibor®; nos demais municípios foram coletados por técnicos da vigilância sanitária, ou vigilância em saúde por demanda da população para exame de leishmaniose, ou recolhidos para eutanásia.

Mapa 9: Localização das áreas I (São Carlos) e II (Vila Piloto) do inquérito sorológico canino. Três Lagoas. 2013-2014



LEGENDA

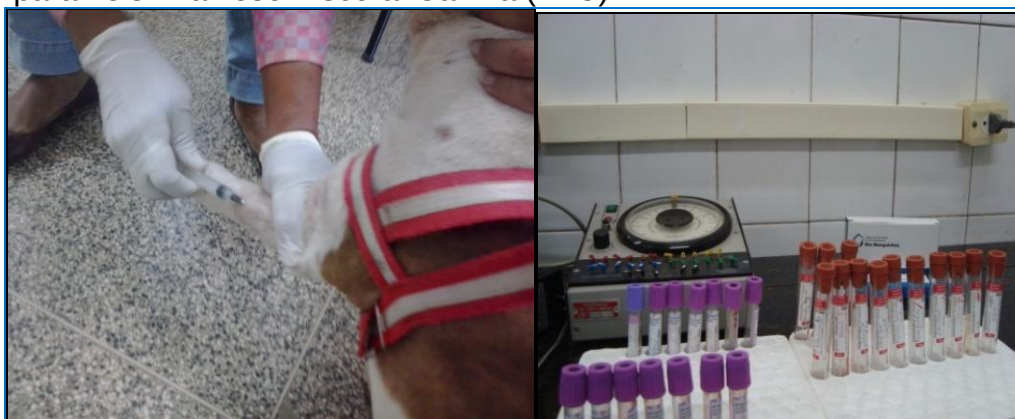
- Três Lagoas
- Mato Grosso do Sul



Após antissepsia com algodão embebido em álcool iodado foi coletado entre cinco a 10 mL de sangue de cada animal utilizando-se seringa descartável acoplada a uma agulha hipodérmica 25 X 7 mm, o que foram acondicionados em tubo vacutainer contendo EDTA para a realização da técnica molecular de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), e em tubo seco, para obtenção de soro, e realização dos testes sorológicos de Dual Path Platform (DPP®), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Figura 10).

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.

Figura 10: Coleta e acondicionamento de amostras de sangue de cães, procedentes de Três Lagoas (MS) durante o inquérito epidemiológico para Leishmaniose Visceral Canina (LVC).



Fonte: Arquivo pessoal

4.6 Análises sorológicas

4.6.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi*

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (1966), sendo utilizados como antígenos formas promastigotas de *L. infantum* e formas epimastigotas de *T. cruzi*, mantidos em tubos rosqueados contendo 10 mL de meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e 5 mL de meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), repicados semanalmente.^{73,74}

Para cada parasito, em capela de fluxo laminar, retirou-se uma gota de cada um dos três tubos de manutenção mais recentes, repique da semana

anterior, colocando-se entre lâmina e lamínula para observação em microscópio óptico, em aumento 40 vezes, para avaliação do crescimento das formas promastigotas e epimastigotas. Do tubo que apresentasse parasitos com melhor motilidade e em maior quantidade, foi repicado 0,5 mL para três novos tubos de meio, procedendo-se, assim uma nova passagem. Os tubos eram mantidos em estufa a 25°C. Após a verificação do crescimento das promastigotas e epimastigotas em microscópio óptico, foram centrifugados 10 mL do meio de LIT a 3000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se de 2 a 3 mL de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2, centrifugando-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, e desprezando-se o sobrenadante. Repetiu-se o processo por mais três vezes.^{73,74}

Os parasitos foram quantificados com o auxílio de microscopia óptica, utilizando-se como antígeno quando se obtinha de 20 a 30 parasitas por campo microscópico, em avaliação de 50 µL do antígeno em lâmina e lamínula 24x60mm. As lâminas de antígeno foram preparadas pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas e epimastigotas em cada um dos orifícios, retirando-se em seguida por aspiração, restando somente uma fina película sobre cada orifício. As lâminas eram secas em temperatura ambiente, e mantidas em laminário à -20°C, até o momento do uso, por um período máximo de duas semanas.^{73,74}

4.6.2 Dual Path Platform (DPP®)

O Teste Rápido (TR DDP®) Leishmaniose Visceral Canina – Biomanguinhos (Anexo 4) emprega a proteína recombinante K39 (rK39) como antígeno, uma sequência de 39 aminoácidos clonada da região quinase específica de *L. chagasi* que tem sido amplamente avaliada no diagnóstico da LVC.⁷⁵

Este é um teste de triagem imunocromatográfico de uso único para a detecção, em cães, de anticorpos específicos para *Leishmania* spp em soro, plasma ou sangue total. Como interpretação do resultado, tem-se soro não reagente (uma linha vermelha) e soro reagente (duas linhas vermelhas)⁷⁵ (Figura 11).

O DPP® é caracterizado por ser rápido, o seu resultado é conhecido após 15 minutos da coleta da amostra biológica e de fácil manipulação, pois

não precisa de técnico especializado para a sua execução. Os exames foram realizados conforme as orientações do fabricante.

Figura 11: Resultado reagente e não reagente do teste para Leishmaniose Visceral Canina (LVC), Dual Path Platform (DPP®).



Fonte: Arquivo pessoal

4.6.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manginhos (Anexo 5), de acordo com o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura in-vitro. Os antígenos obtidos são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas, “strips” (fase sólida).⁷⁶

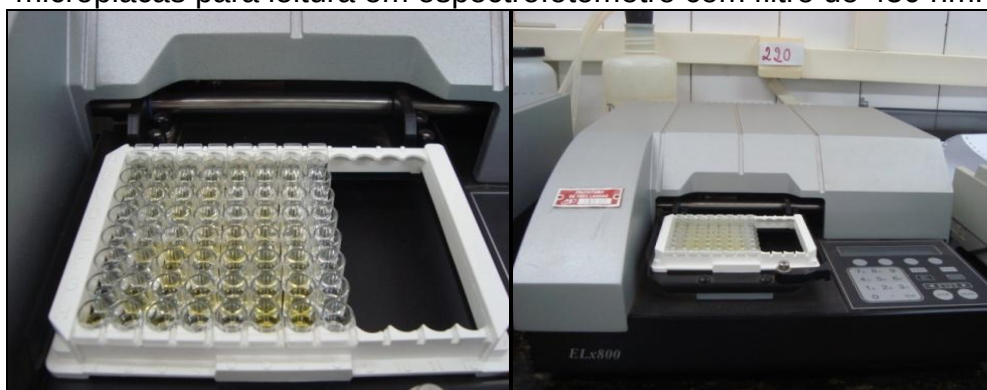
Seguindo as orientações do fabricante, para a realização do teste adicionou-se, nas cavidades da placa os soros controle positivo, negativo e as amostras, previamente diluídas. Em seguida adicionou-se um conjugado específico, antiimunoglobulina, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorre a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB).⁷⁶

A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio forma um composto de cor azul turquesa que ao adicionar o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela (reagente) a intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de IgG anti-Leishmania

presente na amostra (Figura 12). Na ausência de anticorpos específicos, não há desenvolvimento de cor (não reagente).⁷⁶

Os resultados foram avaliados por meio de um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450nm, (Figura 12). A positividade, no ELISA, depende do limiar de reatividade ou “cut-off” fixado para o teste. Segundo o fabricante, para o cálculo do cut-off calculou-se a média das densidades óticas (DO) dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Cálculo CO = XCN x 2. Cálculo da faixa cinza (FC) = CO x 1,2.⁷⁶

Figura 12: Teste ELISA para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em microplacas para leitura em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.



Fonte: Arquivo pessoal

As amostras foram consideradas reagentes quando apresentaram densidade ótica igual ou superior ao cut-off; não reagentes quando a densidade ótica foi inferior ao cut-off; e indeterminadas quando apresentaram densidade ótica entre o cut-off e a faixa cinza.

4.7 Análises moleculares

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®.

4.7.1 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi*

Como forma de triagem para a família Trypanosomatidae, os quais amplificam fragmentos de gêneros da Família Trypanosomatidae, ou seja, tanto

Leishmania spp. quanto *Trypanosoma* spp., utilizou-se os iniciadores da região ITS1 (ilustrado abaixo), segundo El Tai, et al⁷⁷:

sense: LITSR 5' - CTGGATCATTTTCCGATG - 3'

anti-sense: L5-8S 5' - TGATACCACTTATCGCACTT - 3'

Os produtos resultantes são variáveis de acordo com a espécie parasitária. 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 (Neal, Novy, Nicolle) acrescido de LIT foram os controles positivos e a água ultra pura, o controle negativo.

Eletroforese em gel de agarose

Para a identificação dos produtos amplificados realizou-se eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para isso, alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 5µL de solução de azul de bromofenol, e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5.⁷⁸⁻⁸⁰

A agarose foi dissolvida em TBE 0,5X previamente aquecido. O material foi distribuído uniformemente na cuba de eletroforese. A corrida realizou-se a 100 volts por 90 minutos. Ao final, o gel foi corado em solução de Syber Safe® durante uma hora e as bandas visualizadas em transiluminador ultravioleta, com filtro de 300nm. Utilizou-se como controles positivos produtos da cepa amplificada de *L. infantum*, e como negativos água miliQ estéril.⁷⁸⁻⁸⁰

Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o DNA Ladder, 100pb. A visualização das bandas no gel e a foto digitalização foram realizadas sob transiluminação com luz ultravioleta (296 nm), sendo o tamanho dos fragmentos amplificados verificado a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com a cepa padrão utilizada como controle positivo.⁷⁸⁻⁸⁰

Após a identificação das amostras positivas com a utilização dos iniciadores da região ITS1, foram realizadas as provas de PCR utilizando-se

iniciadores específicos para o gênero *Leishmania* spp. e para *Trypanosoma cruzi*, descritas a seguir.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp.

Foram utilizados 5 µL de tampão de PCR (50 mmol KCl, 10 mmol de Tris-HCl), 1,5U de *Taq*-polimerase, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 2 µL da amostra testada e 17,5 µL de água ultra pura (MIX-PCR), em cada tubo de reação de 0,2 mL. Dessa forma, cada tubo conteve 23 µL do MIX-PCR e 2 µL do produto de extração do DNA. As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System 9600) foram seguidas conforme descritas, sendo a 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 e LIN19.⁸¹

LINR4 5'-GGGGTTGGTGTAATAAGGG-3'

LIN19 5'-CAGAACGCCCCTACCCG-3'

Nessa reação, os produtos resultantes apresentaram 720 pares de base (pb) de comprimento, que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp..⁸¹

4.7.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi*

As condições de amplificação em termociclador foram as seguintes: cada tubo de reação de 0,2mL recebeu 5µL de tampão de PCR (50mmolKCl, 10mmol de Tris-HCl), 1,5 U de *Taq*-polimerase, 10pmol de cada oligonucleotídeo, 10µL da amostra a ser testada e 15,2µL de água ultra pura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo ficou com 40µL do MIX-PCR e 10µL do produto de extração do DNA.⁸²

As condições de amplificação em termociclador foram de um ciclo para desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos; desnaturação, anexação dos iniciadores e alongamento em 30 ciclos por um minuto cada a 94°C, 60°C e 72°C,

respectivamente; e um ciclo de 72°C por dez minutos. Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores TCZ1 e TCZ2.⁸²

TCZ1: 5' – CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT - 3'

TCZ2: 5' - CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'

Nesta reação, os produtos resultantes apresentam 188 pares de base (pb) de comprimento, correspondendo à amplificação do fragmento contendo uma região específica da região do microssatélite nDNA de *T.cruzi*.⁸² A cepa “Y” do *T.cruzi* foi utilizada como controle positivo da reação, enquanto a água miliQ estéril foi o controle negativo.

Eletroforese em gel agarose

A identificação dos produtos amplificados foi feita em eletroforese em gel de agarose a 1,5% da mesma forma descrita anteriormente, utilizando-se como controles positivos produtos da cepa amplificada de *Trypanosoma cruzi*, com 188 pares de base.

4.8 Georreferenciamento

A análise espacial da doença em razão da disponibilidade de dados foi realizada somente em Três lagoas. No estudo, foram adotados procedimentos metodológicos a partir da geocodificação dos casos de LVC, do censo canino, total dos cães participantes Inquérito Sorológico Canino (ISC), e casos de LVH, direcionados à base territorial para geoprocessar; e gerar mapas temáticos. Para a construção do banco de dados e o georreferenciamento com as variáveis do estudo, utilizou-se dois tipos de geometrias: processos pontuais e de áreas. Embora os pontos sejam mais precisos, foi preciso correlacionar dados socioeconômicos disponíveis somente em áreas.

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. Ainda 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, possibilitando identificar diferentes padrões de distribuição da doença, onde se obteve 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*⁶⁶. Esse mapa permitiu, por meio de interpolação, estimar a densidade dos números de casos de LVC para todo o município.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Resultados laboratoriais

Os resultados dos testes sorológicos e moleculares para *Leishmania* spp, das 683 amostras de sangue de cães, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Diagnóstico de LVC pelas técnicas sorológicas e moleculares para *Leishmania* spp. dos municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.

Amostras Municípios		Testes sorológicos						Testes moleculares
		DPP [®]		ELISA		RIFI		PCR
		R	NR	R	NR	R	NR	R
Água Clara	23	4	18	4	18	2	21	0
					1*			
Bataguassu	21	4	16	4	16	0	19	0
					1*			
Brasilândia	26	21	5	21	5	12	14	1
Selvíria	47	4	36	4	36	5	42	0
					7*			
Três Lagoas	566	267	275	267	275	97	469	16
		20*	13*	13*	20*			
TOTAL	683	300	350	300	350	100	567	17
		20*	13*	13*	20*	16*		
Positividade		46.9%		44,0%		17.0%		2,5%

*Reagente apenas nesse teste. R: reagente; NR: não reagente. DPP[®]: Dual Path Platform. ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay. RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta. PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase

Ao comparar os resultados dos diferentes métodos sorológicos utilizados no estudo desta Regional de Saúde, para saber se há diferenças significativas entre as frequências observadas, o resultado do teste de qui-quadrado foi:

	X²	GL	p
Teste de Qui-quadrado	160,8722	GL=2	P<0,001

Temos X^2 como sendo o valor da estatística de qui-quadrado, que é um valor bem elevado, 160,8722, indicando pronunciadas diferenças entre as frequências observadas e as que deveriam ser esperadas simplesmente por acaso, os graus de liberdade GL (número de células da tabela de frequência - 1), a tabela comparada se encontra logo abaixo (Tabela 3). Por fim, o mais importante, o valor de $P<0,001$, indicando um resultado significativo, esse valor indica que a probabilidade das diferenças observadas não foi ao acaso.

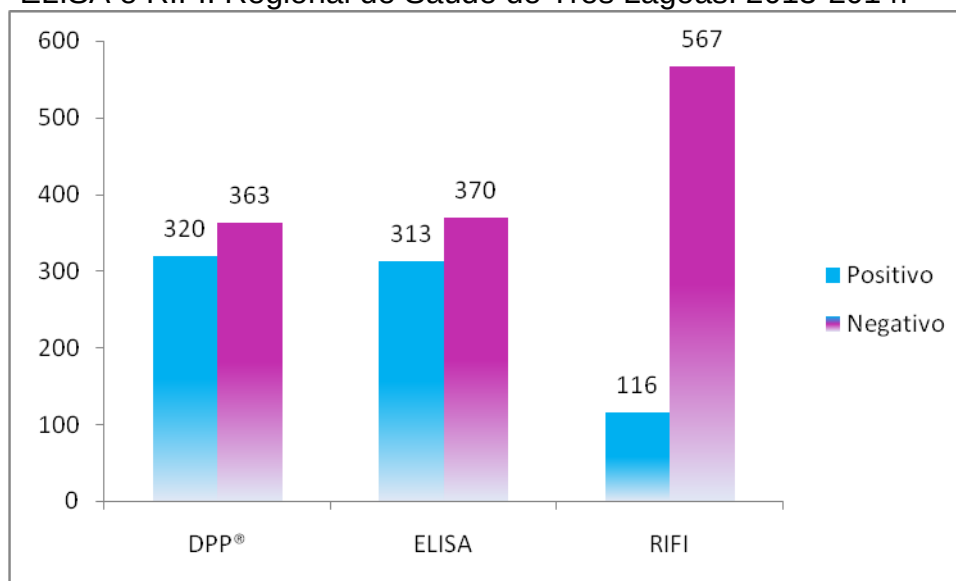
Tabela 3: Diagnóstico de LVC pelas técnicas sorológicas.
Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.

Resultado	DPP®	ELISA	RIFI
Positivo	320	313	116
Negativo	363	370	567
Total	683	683	683

Fonte: CCZ/TL

As seis frequências comparadas diferem entre si, podemos visualizar melhor (Figura 13), sendo a RIFI com maior diferença, tendo frequências de positivos três vezes menor, e de negativos aproximadamente 50 por cento maior que os métodos DPP® e ELISA, estes últimos também diferem entre si tanto em positivos quanto em negativos, com uma diferença menos pronunciada.

Figura 13: Diagnóstico de LVC pelas técnicas sorológicas DPP[®], ELISA e RIFI. Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.



Fonte CCZ/TL

Considerando os testes sorológicos DPP[®] e ELISA, em paralelo, critério preconizado pelo Ministério da Saúde para definir diagnóstico sorológico positivo para LVC²⁶, do total das 683 amostras testadas, foram consideradas positivas 44% (300/683).

A reprodutibilidade, repetibilidade ou precisão, é a habilidade do teste em produzir resultados consistentes (quase os mesmos resultados) quando realizados independentemente e sob as mesmas condições. Há diversas maneiras de verificar a concordância de resultados entre leituras de um mesmo evento ou comparar métodos diagnósticos diferentes, e assim, estimar o erro cometido na sua aferição. A comparação dos resultados pode ser apresentada pelo índice *kapa* (*k*), muito utilizado para expressar a confiabilidade de um teste, é um indicador de concordância ajustada, pois leva em consideração, a concordância devida à chance. Esse índice informa a proporção de concordância não aleatória (além da esperada pela chance) entre observadores ou medidas da mesma variável categórica, e seu valor varia de "menos 1" (completo desacordo) a "mais 1" (concordância total). Se a medida concorda mais frequentemente do que seria esperado pela chance, então o índice *k* é positivo; se a concordância é completa $k = 1$. Zero indica o mesmo que leituras feitas ao acaso.^{83,84}

No estudo, a concordância nos diagnósticos sorológicos foi calculada usando-se o índice k , a partir da tabela de contingência, e a interpretação dos resultados conforme classificação de Shrout⁸⁵ (1998): $k > 0,80$ concordância ótima; $0,60 < k < 0,80$ boa; $0,40 < k < 0,60$ regular e $k < 0,40$ ruim.

Os testes ELISA e DPP[®] revelaram concordância ótima. Não ocorrendo o mesmo quando comparados com a RIFI, Tabelas 4, 5 e 6. Estes dois testes são utilizados para o diagnóstico de LVC sendo que o DPP[®] como teste de triagem é de fácil realização e rapidez no resultado e apresenta a vantagem de ser compatível com sangue, soro ou plasma, e apenas uma gota de sangue do animal é suficiente para triagem eficaz no próprio local da coleta.

Tabela 4: Comparação entre o teste ELISA e DPP[®].
Três Lagoas. MS. 2013-2014

		ELISA		Total
		+	-	
DPP [®]	+	300	20	320
	-	13	350	363
Total		313	370	683

$k = 0.90$

Tabela 5: Comparação entre o teste RIFI e DPP[®].
Três Lagoas. MS. 2013-2014

		RIFI		Total
		+	-	
DPP [®]	+	100	220	320
	-	16	347	363
Total		116	567	683

$k = 0.30$

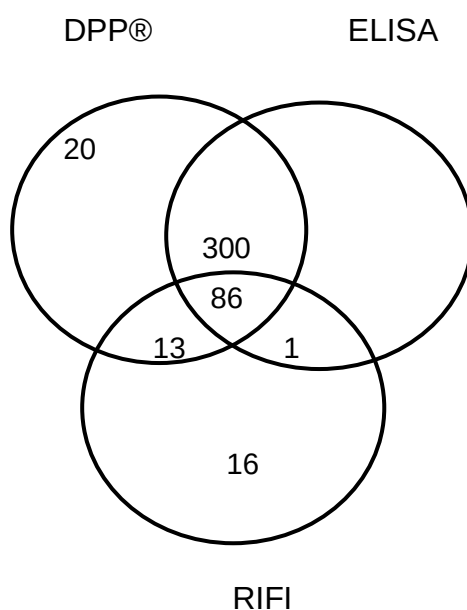
Tabela 6: Comparação entre o teste RIFI e ELISA.
Três Lagoas. MS. 2013-2014

		RIFI		Total
		+	-	
ELISA	+	100	213	313
	-	16	354	370
Total		116	567	683

$k = 0.32$

Considerando a associação dos testes em paralelo, e reagente para qualquer um, 20 foram reagentes ao DPP® e 16 ao RIFI, e as amostras reagentes dos testes sorológicos simultaneamente, 300 foram no grupo DPP®/ELISA, 86 DPP®/ELISA/RIFI, 13 DPP®/RIFI, 1 ELISA/RIFI. (Figura 14).

Figura 14: Diagrama dos resultados reagentes nos testes sorológicos DPP®, ELISA e RIFI.



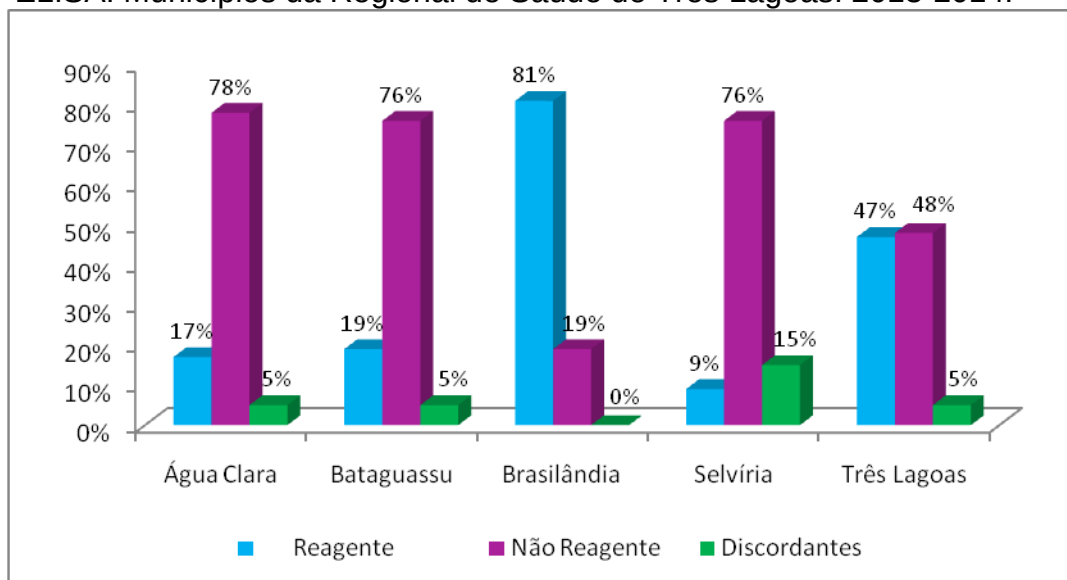
Fonte: CCZ/TL

Na Figura 15, observa-se o diagnóstico sorológico de LVC pelas técnicas de DPP® e ELISA. Do município de Brasilândia foram analisadas 26 amostras e 81% (21/26) foram reagentes. É provável que, por tratar-se de demanda espontânea, a população deste município solicite os exames ou recolha para eutanásia somente de cães doentes, com LVC ou outras doenças, visto que os testes não reagentes foram 19% (5/26). Cães sintomáticos possuem nível elevado de anticorpos quando comparados com assintomáticos.^{86,87} Em relação à Selvíria, foram encontradas 9% (4/47) das amostras reagentes e 76% (36/47) não reagentes.

Os municípios de Água Clara e Bataguassu, apesar de apresentarem resultados semelhantes pelas técnicas de DPP® e ELISA, (Figura 15), segundo a Vigilância Epidemiológica (VE) de Bataguassu, os resultados reagentes referem-

se a cães sintomáticos e procedentes do interior do estado de São Paulo, que é limítrofe com o município; já os de Água Clara são considerados casos autóctones pela VE do município.

Figura 15: Diagnóstico sorológico de LVC pelas técnicas de DPP® e ELISA. Municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.



Fonte: CCZ/TL

Em um estudo, no estado de São Paulo de 1999 a 2011, com a participação de 316 municípios pertencentes às cinco regiões de saúde com ocorrência de LVH, utilizando o estimador bayesiano empírico para obtenção de taxas de incidência e de mortalidade bayesianas locais para cada município e a krigagem para visualização da distribuição espacial das temperaturas e das precipitações pluviométricas, demonstraram a expansão da LVH na região de Araçatuba a partir de sua sede (Araçatuba) para outros municípios dessa região em 1999 (Birigui); na região de Bauru, com a detecção de casos em Promissão, em 2002; na de Marília, com casos em Guarantã, em 2003; na região de Presidente Prudente, com casos em Dracena e Ouro Verde, em 2005; e na de São José do Rio Preto, com a detecção de casos em Jales, em 2007. Ocorreram casos autóctones em 73 municípios do estado neste período. Essa expansão apresentou um eixo principal de disseminação, na direção noroeste para sudeste e no sentido da região de Bauru, seguindo a rodovia Marechal Rondon, a ferrovia Novoeste e a construção do gasoduto Bolívia-Brasil. Apresentou também um eixo secundário de disseminação a partir do

eixo principal, no sentido sul, para as regiões de Presidente Prudente e Marília, e no sentido norte, para a região de São José do Rio Preto.⁸⁸

Verifica-se na Figura 15 que do município de Três Lagoas, 47% (267/566) das amostras foram reagentes e 48% (275/566) não reagentes, sendo discordantes 5% (24/566). Por tratar-se de amostras de inquérito epidemiológico do CCZ/TL, e o município considerado endêmico para LVC, este resultado reforça a endemicidade da doença. Das 566 amostras, 286 eram da Área I do inquérito com 141 (49%) reagentes aos testes DPP® e ELISA, considerados positivo para LVC, e da área II do inquérito foram 280 amostras com 126 (45%) reagentes.

Em áreas endêmicas, apesar de ocorrer à disseminação da infecção nem todos os cães infectados desenvolvem a doença, uma vez que a maioria desta população está exposta, tornando-se infectados sem evidências clínicas da doença ou anticorpos contra *Leishmania* spp.⁵⁶

O desempenho do teste no diagnóstico da LVC está relacionado com o tipo de antígeno utilizado, e também com o estado clínico do cão. Cães sintomáticos possuem nível elevado de anticorpos quando comparados com assintomáticos. A elevada produção de anticorpos e a hipergamaglobulinemia observada na LVC é resultado da estimulação policlonal de linfócitos B, facilitando o diagnóstico pelos testes sorológicos^{86,87} que nos inquéritos epidemiológicos, são as principais ferramentas para a identificação de cães infectados.

O número de cães assintomáticos pode chegar a 80% da população infectada, demonstrando que a sua importância na epidemiologia da doença não é somente o fato de apresentar altas prevalências de infecção comparada à espécie humana.^{56,89} Devido à ausência de sintomas ou por resultados falso-negativos nos exames sorológicos deixam de ser identificados, mas servem de fonte de infecção para o vetor.⁵⁶

Alguns cães apresentam sinais clínicos da doença logo após a infecção, mas em outros animais a infecção pode prosseguir sem sintomas. Os primeiros são incapazes de desenvolver uma imunidade celular efetiva, mas desenvolvem imunidade humoral, e podem ser identificados por sorologia. Os assintomáticos podem permanecer desta forma por anos ou mesmo por toda a

vida. Porém qualquer alteração em seu estado imune pode levar ao aparecimento dos sintomas da doença⁵⁶.

Os sintomas inespecíficos ou tardios contribuem para o subdiagnóstico da doença e transmissão do parasita no ambiente doméstico. Apesar da discordância relacionada à importância epidemiológica desses animais, recentemente comprovou-se que cães assintomáticos são altamente competentes para estabelecer a infecção em flebotomíneos, demonstrando o seu papel na manutenção do ciclo epidemiológico da doença. Alta prevalência de cães assintomáticos sugere a manutenção do ciclo de transmissão da LV na mesma proporção, ou até em proporção superior aos cães sintomáticos.⁹⁰

Pela técnica de RIFI observou-se que, para *Leishmania* spp., do total de amostras analisadas (n=683) foram reagentes, 17% (116/683), com a titulação variando entre 40 e 640. Das amostras analisadas, as do município de Brasilândia apresentaram maior positividade, com 46% (12/26), seguido de Três Lagoas, com 17% (97/566), Selviria 11% (5/47) e Água Clara 9% (2/23). No município de Bataguassu nenhuma das 21 amostras foi reagente por este método, Tabela 7.

Tabela 7: Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* spp. e *T. cruzi* em cães de municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas (MS). 2013-2014.

Municípios	Amostras Nº	<i>Leishmania spp</i>		<i>T. cruzi</i>	
		Nº	%	Nº	%
Água Clara	23	2	9	0	0
Bataguassu	21	0	0	0	0
Brasilândia	26	12	46	0	0
Selviria	47	5	11	0	0
Três Lagoas	566	97	17	4	1
TOTAL	683	116	17	4	1

Fonte: CCZ/TL

Pode-se verificar na Tabela 8, que das 116 amostras, foram reagentes apenas ao teste de RIFI 16 amostras, identificando 16 animais soronegativos para DPP® e ELISA.

Tabela 8: Resultados sorológicos de LVC pelas técnicas sorológicas. Municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas. 2013-2014.

Testes sorológicos	Nº	%
RIFI/DPP®/ELISA reagente	86	74
RIFI/DPP® reagente	13	11
RIFI/ELISA reagente	1	1
RIFI reagente	16	14
Total	116	100

Fonte: CCZ/TL

O diagnóstico sorológico deve ser de alta confiabilidade para a triagem dos cães, evitando-se a propagação da doença, a eliminação de cães negativos, a permanência dos positivos no local, e assegurando uma maior credibilidade entre os proprietários dos animais.⁹¹

Com intuito de aperfeiçoar a técnica de diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde (MS) a partir do ano de 2011, preconizou para todos os CCZ a utilização do DPP® como teste de triagem e ELISA como teste confirmatório. Desta forma é considerado resultado sorológico reagente para LVC, quando as duas técnicas DPP® e ELISA apresentam-se reagentes. A prova de RIFI até então utilizada, apresenta menor sensibilidade (72% a 100%) e especificidade (52% a 100%) quando comparada a outras técnicas sorológicas. Além de necessitar de corpo técnico treinado é sujeita a uma subjetividade de interpretação à leitura das lâminas, quando comparada à técnica de ELISA, o que justificou a sua substituição pelo Ministério da Saúde.^{32, 92-94}

Em 2013, Silva et al. avaliando o desempenho do DPP® e RIFI *L. major-like*, encontraram maior sensibilidade para o primeiro, além da ausência de reações cruzadas nos cães infectados com *L. braziliensis* e *Trypanosoma caninum*. Costa et al. (2003), ao padronizar um teste usando as proteínas recombinantes rK26 e rK39, obtiveram sensibilidade de 83 a 96% e especificidade de 100%.⁹⁵ Outros autores, trabalhando com testes imunocromatográficos baseados em rK39, observaram uma sensibilidade de 72% a 97% e especificidade de 61%.⁹⁶

O uso de antígenos recombinantes aumenta a especificidade de testes diagnósticos quando comparado ao uso de antígenos brutos. Vários antígenos

recombinantes têm sido testados como ferramentas para melhorar o diagnóstico da LV. A proteína K39, um epitopo imunodominante repetitivo em uma proteína relacionada à kinesina, e muito conservada entre as espécies viscerotrópicas de leishmania, tem sido amplamente avaliada sob a forma recombinante (rK39) como antígeno em ELISA e têm se mostrado sensível e específica para o diagnóstico da LVC e LVH.⁷⁵

Badaró et al.⁹⁷ demonstraram a utilidade da rK39 no diagnóstico de cães sintomáticos e Scalone, et al., (2002) trabalhando com cães provenientes de uma área endêmica no sul da Itália, obtiveram 97,1% de sensibilidade e 98,8% de especificidade.^{97,98}

Segundo Romero & Boelaert⁹⁹, a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos variam de acordo com a definição dos casos e controles de um estudo. Diversos trabalhos demonstraram uma sensibilidade, em alguns casos, baixa para o teste ELISA, variando de 30% a 100% e especificidade de 64% a 100%.^{32,91,93,100,101} Entretanto para o mesmo teste ELISA, Figueiredo et al.¹⁰² observaram melhor sensibilidade (100%) e especificidade (96,6%).

O kit EIE Leishmaniose Visceral Canino distribuído pelo Ministério da Saúde, no Brasil, usa *L. major-like* como antígeno, que não é o agente etiológico circulante no país. Esse fato gera discussões sobre a substituição por um antígeno homólogo de *L. infantum*, uma vez que este pode ser capaz de produzir melhores performances, podendo aumentar a especificidade dos testes sorológicos. Estudo avaliando diferentes testes sorológicos para LVC em área endêmica do Rio de Janeiro demonstrou maior especificidade do teste ELISA *L. infantum* quando comparado ao ELISA *L. major-like*.¹⁰³ Porém, Arruda et al.¹⁰⁴ obtiveram acurácia e confiabilidade semelhantes para ambos os antígenos no teste ELISA, sugerindo não haver evidências suficientes para a substituição do antígeno nos testes atualmente utilizados no Brasil.¹⁰⁴

Na análise das amostras de sangue canino, pela técnica de RIFI para *T. cruzi*, somente o município de Três Lagoas obteve 1% (4/566) das amostras reagentes, com titulação variando entre 20 e 40, neste caso, deve-se considerar a hipótese de reação cruzada para *Leishmania* spp. uma vez que esse município é endêmico para LVC e a coinfeção com *T. cruzi* em cães é um achado frequente em áreas endêmicas, e pode interferir nos resultados pela possibilidade de reações cruzadas.^{74,87}

Relacionado à análise molecular, obteve-se êxito na amplificação de fragmentos pela PCR, para *Leishmania* spp., em 17 (3%) dos cães. Destas amostras, 16 delas 3% (16/566) eram procedentes de diversos bairros de Três Lagoas, e uma amostra 4% (1/26) era do município de Brasilândia. O uso desta técnica permitiu a identificação de seis animais soronegativos para DPP® e ELISA em Três Lagoas, sendo quatro na Área I do inquérito, e dois na Área II, bem como a identificação de um animal em Brasilândia.

A partir da quantificação do DNA das amostras positivas, verificou-se serem insuficientes para a purificação e realização do sequenciamento.

O uso de técnicas moleculares para o diagnóstico da LVC, particularmente em animais soronegativos, permite a confirmação de que quando as condições são favoráveis para a transmissão da doença (tais como altas densidades de animais e de flebotomíneos), a infecção se dissemina rapidamente pela população canina.⁵⁶

Quanto aos gambás foram coletadas 39 amostras de sangue (n=39) todos de Três Lagoas, os quais foram submetidos a testes moleculares, e todas foram negativas para *Leishmania* spp. à prova de PCR. A técnica de PCR para *T.cruzi* a partir das amostras de sangue total dos cães e gambás também foram negativas.

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.¹⁰⁵⁻¹¹⁰ Além disso, a sensibilidade da PCR poderia ser incrementada se o DNA fosse extraído diretamente de outros materiais biológicos, como medula óssea, baço ou linfonodo²⁸.

Santos et al.¹⁰⁸ em um estudo com sangue total de 18 cães reagentes à leishmaniose pela técnica de RIFI, observaram que nenhuma dessas amostras foi reagente à PCR⁶¹, sendo uma das hipóteses para este resultado o baixo número de parasitos presentes no sangue.⁸⁷

No entanto, outros estudos sugerem que amostras sanguíneas constituem material confiável para o diagnóstico da LVC, apresentando coleta simples e pouco invasiva^{81,111,112} demonstraram a elevada sensibilidade da técnica ao utilizar células mononucleares de sangue periférico, e também

relataram resultados positivos para LnPCR (métodos que apresentam como alvo a região codificante) em cães cujos níveis específicos de imunoglobulinas eram muito próximos aos do cut-off no ELISA, indicando ser uma ferramenta sensível e específica para o diagnóstico da LVC.¹¹⁰

A PCR na fase aguda da doença apresenta sensibilidade alta nos primeiros cinco meses, caindo para 50% após 10 meses. No sangue total, apesar de ser uma coleta menos invasiva, a sensibilidade da PCR mostra-se inferior àquela obtida em outros tecidos. A explicação para estas variações é a distribuição heterogênea dos parasitos em cada tecido, devido ao tropismo da cepa e a resposta imune local.¹⁰⁹ A pele tem sido muito utilizada por apresentar alto parasitismo, facilidade de obtenção e a distribuição homogênea de parasitos.¹¹³

Com aumento da sensibilidade e especificidade essa técnica tem alta habilidade em detectar e identificar o DNA do parasita produzindo um resultado confiável,¹¹⁴ sendo que a sensibilidade varia conforme a amostra utilizada na reação, bem como o iniciador empregado.¹⁰⁵

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, tais como sangue periférico, linfonodos, medula óssea, soro, pele, urina, etc.³⁹

Considerando a elevada acurácia destas técnicas, elas representam um grande avanço no diagnóstico canino. Apesar de ser uma alternativa para identificar a infecção, quando os resultados são indeterminados ou negativos em outros testes, visto que foi identificada excelente correlação entre os resultados da PCR e o teste sorológico e parasitológico,¹¹⁵⁻¹¹⁸ o alto custo desse ensaio, a necessidade de profissionais treinados, infra-estrutura laboratorial, acabam restringindo o uso da PCR à pesquisa científica, tornando-se um grande desafio a sua aplicação em áreas endêmicas de países em desenvolvimento.^{32,109}

5.2 Leishmaniose Visceral

Leishmaniose Visceral Humana (LVH)

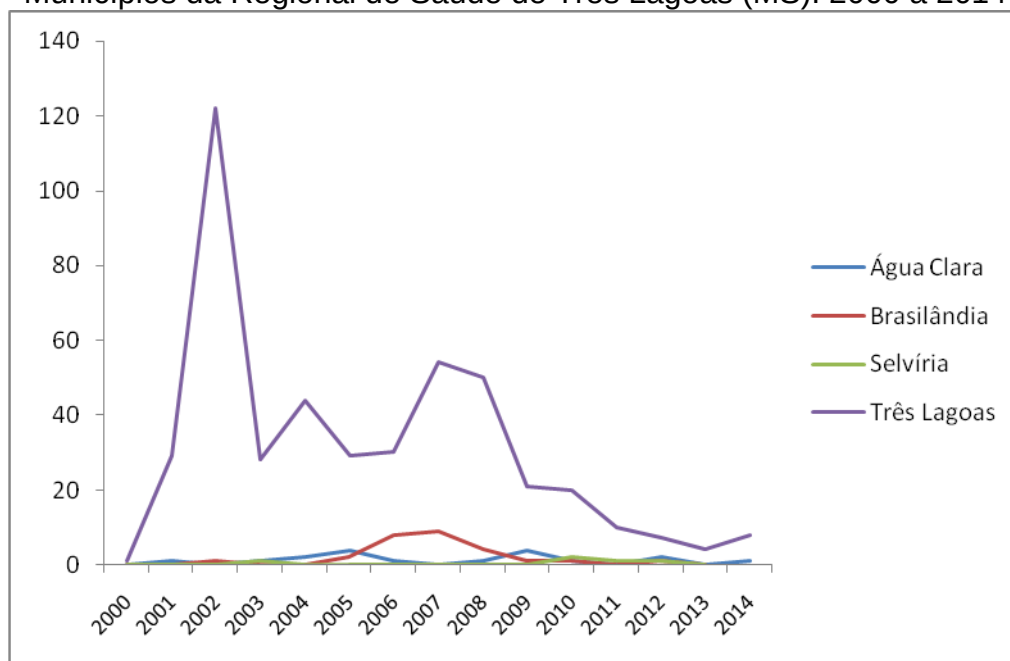
Em um estudo realizado sobre a ecoepidemiologia da LV no estado do Mato Grosso do Sul, apontou que a expansão e disseminação da doença iniciaram em 1998, e inicialmente fora estabelecida nas áreas periféricas dos municípios e em seguida ocorreu à disseminação para as áreas mais centrais e/ou por toda a área urbana. O início dessa expansão coincide no espaço (rota) e no tempo com a migração de milhares de trabalhadores e o início da execução do projeto de construção do gasoduto Bolívia-Brasil, 1997 a 1999.¹¹⁹

A rota de expansão e disseminação da LV deu-se no sentido oeste para leste, de Corumbá para Três Lagoas, passando por Campo Grande. Os municípios de Corumbá, Miranda, Aquidauana, Anastácio, Campo Grande, Ribas do Rio Pardo e Três Lagoas, a BR 262 é a rodovia que interliga estes municípios e possibilita o acesso a rodovia Marechal Rondon no estado de São Paulo. Também, estes municípios, concentraram trabalhadores migrantes do gasoduto, compondo a rota principal da expansão da LVA, disseminando a doença a partir destes para os demais municípios sulmatogrossenses e interior de São Paulo.^{88,119}

No período de 2000 a 2014 a regional de saúde do estudo, registrou 507 casos de LVH (Anexo 3). Três Lagoas foi 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 apresenta tendência decrescente. O segundo município com maior número de casos foi Brasilândia com 27 casos, seguida de Água Clara com 18 e Selvíria com cinco casos (Figura 16). O município de Bataguassu foi o único que não apresentou nenhum caso autóctone.

Ainda, nesse período ocorreram 58 óbitos, sendo 84% (n=49) em Três Lagoas (Anexo 3). Observa-se ainda, que o período que ocorreu o maior número de casos, a ocorrência de óbitos foi menor proporcionalmente, é provável que nesse período a atenção à saúde estivesse mais atenta ao diagnóstico precoce da doença.

Figura 16: Número de casos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH). Municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas (MS). 2000 a 2014



Fonte: NRS/TL

No período do estudo, 2013 e 2014, segundo o Núcleo Regional de Saúde (NRS/TL), nos municípios de sua abrangência ocorreram 13 casos de LVH. Sendo quatro no ano de 2013, e 100% deles residentes em Três Lagoas e taxa de incidência de 3,6/100.000 habitantes, com dois óbitos e 50% de letalidade (Tabela 9).

Em 2014, foram nove os casos de LVH na regional, sendo um caso (11%) residente em Água Clara e oito casos (89%) residentes em Três Lagoas e a incidência foi de 7 e 7,1/100.000 habitantes respectivamente. Também ocorreu um óbito em Três Lagoas e o coeficiente de letalidade foi de 12,5% (Tabela 7). Nos demais municípios desta regional de saúde não ocorreram casos de LVH no período analisado.

Tabela 9: Número, percentual, incidência e letalidade de Leishmaniose Visceral Humana (LVH), segundo os municípios pertencentes à Regional de Saúde de Três Lagoas (MS). 2013 e 2014.

Municípios	Casos		Coeficiente de Incidência 100.000/hab	Óbitos		Coeficiente de Letalidade %
	Nº	%		Nº	%	
2013						
Três Lagoas	4	100	3,6	2	100	50
2014						
Água Clara	1	11	7	0	0	0
Três Lagoas	8	89	7,1	1	100	12,5

Fonte: NRS/TL

Em 2013, como se pode observar na Tabela 10, os casos ocorreram em diferentes bairros. Quanto ao sexo, do total, três eram do sexo masculino e um do sexo feminino.

No ano de 2014, dos oito casos notificados, observou-se a concentração no bairro São Carlos com 50% (n=4) dos casos, Tabela 10. 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 à faixa etária, seis deles eram crianças de nove meses a quatro anos, um caso de 32 anos e um caso de 60 anos.

A faixa etária mais acometida no período do estudo foram os menores de quatro anos, Tabela 11, inclusive com um óbito de uma criança com nove meses.

Os casos, do estudo, ocorreram tanto em bairros bem estruturados referente às condições socioeconômico e de infra-estrutura de saneamento básico, quanto em bairros da periferia carente destas estruturas, e todas as casas eram de alvenaria.

Uma das características do município é 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 é grande a quantidade de quintais com presença de árvores frutíferas. Existem ainda, muitos terrenos baldios, até mesmo em razão dos novos loteamentos, com restos de vegetação. Esta situação favorece a expansão da *L. longipalpis*.

Tabela 10: Número de casos de LVH segundo o bairro de residência. Três Lagoas. 2013 e 2014.

Bairros - 2013	Nº	%
Jardim Orquídeas	1	25
Jardim Novo Aeroporto	1	25
Vila Nova	1	25
Vila Piloto*	1	25
TOTAL	4	100
Bairros - 2014	Nº	%
São Carlos**	4	50
Santa Luzia	1	12,5
Santa Rita	1	12,5
Jardim das Paineiras	1	12,5
Jardim primavera	1	12,5
TOTAL	8	100

Fonte: VE/TL

*Área II e ** Área I do inquérito.

Tabela 11: Número de casos de LVH segundo a faixa etária. Três Lagoas. 2013 e 2014.

Faixa etária (em anos)	2013		2014	
	Nº	%	Nº	%
< de 4	6	75	1	25
4 - 10	0	0	0	0
10 - 30	0	0	0	0
30 - 60	1	12,5	1	25
≥ 60	1	12,5	2	50
TOTAL	8	100,0	4	100

Fonte: VE/TL

Apenas uma pequena parcela de indivíduos infectados desenvolve sinais e sintomas da doença. Observa-se que, na inexistência da doença, os exames que pesquisam imunidade celular ou humoral, permanecem reativos por longo período. Conclui-se que a *Leishmania* ou alguns de seus antígenos estão presentes no organismo infectado durante longo tempo, após a infecção inicial. Essa hipótese está apoiada no fato de que indivíduos que desenvolvem alguma imunossupressão podem apresentar quadro de LV além do período habitual de incubação¹⁰.

No Brasil, a doença é mais frequente em 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 peridomicílio¹⁰.

A imunosenescência ou envelhecimento imunológico está associado ao progressivo declínio da função imune, aumentando a vulnerabilidade dos indivíduos para infecções, doenças autoimunes e neoplasias. Esse processo, em média, é mais significativo após os 60 anos de idade e está associado a alterações que podem ocorrer em qualquer das etapas do desenvolvimento da resposta imunológica.¹²⁰

Botelho e Natal,¹²¹ em um estudo epidemiológico sobre casos de LVH em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, verificaram que crianças 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%.

Leishmaniose Visceral Canina

As transformações no ambiente provocadas pelo processo migratório, questões sócio econômicas, o 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 visceral¹⁰. Considerando a LVC, esta situação também favorece o flebotomíneo, para sua alimentação não vai necessitar se deslocar para áreas muito distantes. Em áreas com ocorrência da doença, pode-se encontrar mais de um animal infectado no domicílio.

Para maior efetividade ao planejamento e à 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.¹²² Além disso, o conhecimento sobre a população canina permite estabelecer estratégias eficazes para as ações de controle no município.

O censo canino realizado na área urbana de Três Lagoas, em 2013, contabilizou 20.336 cães, ou seja, 1:5,4 habitante, 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 habitantes⁹⁵. A estimativa de cães para os demais municípios, segundo o Ministério da Saúde foi de: Água Clara (n= 2013), Bataguassu (n=3919), Brasilândia (n=2508) e Selvíria (n=1938).

A fim de otimizar os recursos humanos e financeiros, e também 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. 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 $\geq 4,4$ ²¹.

A situação epidemiológica de Três Lagoas é propícia para o surgimento de novos casos humanos em razão da LVC, sendo considerado de transmissão intensa, devido os casos de LVH ocorrido nos últimos três anos. Os municípios de Brasilândia e Água Clara vêm registrando aumento dos casos de LVC, mas são considerados de transmissão esporádica para LVH.

Para o Ministério da Saúde 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 doença¹⁰.

Segundo o CCZ/TL a soroprevalência de LVC dos municípios do estudo nesse período foi: Água Clara 74%, Bataguassu 19%, Brasilândia 91%, Selvíria 13% e Três Lagoas 29%. Sendo que os dados de Três Lagoas incluem os dados do inquérito sorológico canino e a demanda espontânea da população. Os demais municípios somente atenderam a solicitação dos proprietários dos cães e os dados foram baseados nos animais recolhidos para eutanásia.

Inquéritos constituem importantes ferramentas 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.¹²³ Dos municípios do estudo apenas Três Lagoas realiza, uma vez que os critérios são baseados na ocorrência dos casos humanos dos últimos três anos²¹.

Com exceção de Três Lagoas, atualmente os municípios realizam o teste DPP® para triagem e encaminha as amostras sanguíneas para realização do teste ELISA ao Laboratório Central do Estado (LACEN/MS) em Campo Grande.

A remoção e eutanásia dos cães infectados pela *Leishmania* ocorrem mediante o resultado reagente em dois testes sorológicos, e é recomendada pelo Ministério da Saúde como uma ação integrada a demais ações de controle da doença.

A retirada dos cães positivos se mostrou eficaz para diminuir a carga da doença canina, e teve influencia na incidência de LVH na Bahia e em Minas Gerais. Esta ação apresenta efeito temporário, sendo insuficiente quando considerada de forma isolada no controle da LVC, mas quando adotada em conjunto com outras recomendações do Ministério da Saúde, tratamento dos casos humanos e controle vetorial, podem ser eficazes no combate à doença em áreas endêmicas.^{21,124} 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.^{125,126}

Com exceção de Selvíria, os demais municípios trazem rotineiramente os animais recolhidos para eutanásia no CCZ/TL, na Tabela 10 encontra-se o número de eutanásias realizadas neste CCZ, e pode se observar a realização de eutanásia sem diagnóstico laboratorial, considerando apenas os sintomas clínicos. Em clínicas veterinárias de Três Lagoas também ocorreram eutanásia sendo 266 em 2013 e 131 em 2014.

As análises mostraram que no município do estudo, existem condições favoráveis para a transmissão dessa zoonose e os riscos estão associados à densidade canina e humana.

Tabela 12: Número de cães eutanasiados segundo o diagnóstico. Municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas em 2013 e 2014.

Municípios	2013	2014	TOTAL
Água Clara			
ER	11	67	78
SC	9	19	28
Bataguassu			
ER	1	3	4
SC	0	3	3
Brasilândia			
ER	28	143	171
SC	6	9	15
Selvíria			
ER	3	4	7
SC	2	3	5
Três Lagoas			
ER	632	1471	2103
SC	3927	2187	6114
TOTAL	4619	3909	8528

Fonte: CCZ/TL.

ER= Exame reagente

SC= somente sintomas clínicos

Segundo o Ministério da saúde, são considerados municípios silenciosos para LV, quando não foram registrados casos autóctones de LV em seres humanos e em cães nos últimos três anos. Esses municípios são classificados segundo receptividade e vulnerabilidade. A receptividade é definida pela presença confirmada de *L. longipalpis* ou *L. cruzi*.²¹

A vulnerabilidade é definida pela possibilidade da introdução ou circulação de fontes de infecção de *L. infantum*, sendo considerado vulnerável quando cumpre pelo menos um dos critérios: ser contíguo a município(s) com transmissão de LVC ou LVH, considerando o território nacional e os países de fronteira; possuir fluxos migratórios nacionais ou internacionais intensos; integrar o mesmo eixo rodoviário de outros municípios com transmissão.²¹

Desta forma de acordo com a vulnerabilidade e a receptividade, os municípios silenciosos obedecem à seguinte classificação: municípios silenciosos vulneráveis receptivos quando atendem aos critérios estabelecidos

para vulnerabilidade e receptividade; municípios silenciosos vulneráveis não receptivos quando atendem aos critérios estabelecidos para a vulnerabilidade, mas não para a receptividade; municípios silenciosos não vulneráveis receptivos, não atendem aos critérios estabelecidos para vulnerabilidade, mas atendem ao de receptividade; municípios silenciosos não vulneráveis não receptivos, não atendem aos critérios estabelecidos para vulnerabilidade e receptividade.²¹

Dos cinco municípios do estudo desta Regional de Saúde, quatro possuem casos humanos e caninos autóctones notificados nos últimos três anos, Água Clara, Brasilândia, Selvíria e Três Lagoas. Apenas Bataguassu não possui casos autóctones de LVC e LVH, mas a sua proximidade com cidades onde tem a ocorrência de LVC, a rodovia que passa pelo município interligando Mato Grosso do Sul ao estado de São Paulo propiciando o intercâmbio de animais com LVC de outras cidades, fator de risco reconhecido para difusão da doença, a presença do vetor, às condições climáticas também favoráveis à manutenção da doença, esse município apresenta-se como área silenciosa, vulnerável e receptiva para a ocorrência de casos humanos.

5.3 Doença de Chagas

Doença de Chagas Humana (DCH)

Em relação à vigilância epidemiológica da DC, é preconizado pelo Ministério da Saúde a notificação e investigação somente dos casos agudos da doença. Nos municípios dessa regional, segundo o SINAN, não houve nenhum caso agudo da doença notificado no período do estudo. Durante o pré-natal é realizado a triagem sorológica incluindo a DCH, e também não foi identificado nenhum caso agudo.

Segundo o que se encontrou na literatura sobre a prevalência da DCH em Mato Grosso do Sul, no Inquérito Sorológico Nacional sobre a doença de Chagas (1975-1980), a estimativa da soroprevalência para todo o Estado era de 2,5%. No período de janeiro de 1998 a dezembro de 1999, encontrou-se 1,83% de indivíduos soropositivos entre 14.709 moradores investigados, na área urbana de 12 municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (MS).^{127,128}

O Ministro da Saúde do Brasil, em nove de junho de 2006, recebeu uma certificação da OMS da virtual eliminação, no país, da transmissão da doença de Chagas pelo seu principal vetor, o *Triatoma infestans*. Infelizmente após essa eliminação, o controle da transmissão transfusional e congênita, as ações contra a DCH e a pesquisa correspondente perderam o peso político de continuidade, como forma de consolidar o controle da doença no país. Deve-se considerar a domiciliação de triatomíneos secundários e silvestres, migrações e urbanização humana, descentralização das ações de saúde, desativação de instituições etc.¹²⁹

Quando em uma região ocorre a eliminação das espécies primárias, devido ao controle, espécies de triatomíneos secundárias quanto à capacidade vetorial, podem ocupar esse nicho ecológico “vago”, fenômeno conhecido como sucessão ecológica. A reinfestação pode ocorrer pela habilidade dos triatomíneos em se dispersar por diferentes habitats.¹³⁰

No Brasil, existem focos remanescentes em vários estados. Observa-se que a eliminação da doença é prejudicada pelo progressivo desinteresse político. Mesmo em áreas onde a transmissão é declarada zero, há um contínuo risco de transmissão vetorial devido à sobrevivência do inseto e a baixa atividade de vigilância.¹³¹

Existem desafios da DCH no Brasil como o risco de reemergência do *T. infestans* a partir de resíduos dessa espécie nos Estados. Além disso, é imprescindível o conhecimento acerca dos diferentes ciclos enzoóticos que ocorrem no ecótopo silvestre, pois inclui uma rede complexa de interação com uma ampla diversidade de hospedeiros mamíferos e vetores. O perfil epidemiológico da doença também mudou, preocupando as autoridades públicas da vigilância em Saúde, com aumento de surtos de DCH aguda pela via oral pela ingestão de alimentos contaminados.^{13,14,132}

Doença de Chagas (DC) em cães

Neste estudo como citado anteriormente, das quatro amostras de sangue dos cães reagentes na RIFI, para *T. cruzi*, deve-se considerar a possibilidade de reação cruzada com *Leishmania* spp., considerando-se a endemicidade da LVC e por apresentar baixo título (40).⁷⁴ Ressalta-se não ser um procedimento rotineiro para a maioria dos cães passarem em consulta

clínica por médico veterinário, considerando as condições socioeconômicas da população, hábitos culturais entre outros. Sugere-se que novos estudos devam ser realizados.

Na literatura a maioria dos estudos de DC em cães foi realizada após inoculações experimentais ou baseada na identificação de alterações post-mortem e os estudos caracterizando os aspectos clínicos e os laboratoriais de infecções naturais dessa doença, em menor quantidade.¹³³⁻¹³⁵

Segundo Souza et al.¹³⁶ em um inquérito sorológico para DC em Mato Grosso do Sul, dos 75 cães provenientes de uma comunidade Quilombola no município de Jaraguari, considerada área endêmica para a doença, quatro deles apresentaram positividade por três testes sorológicos: kits comerciais para RIFI para *T. cruzi* e *Leishmania* spp., produzidos pela Bio-Manguinhos, teste de ELISA para *T. cruzi* e *Leishmania* spp. e immunoblotting com antígeno secretado e excretado da forma tripomastigota do *T. cruzi* (TESA-blot) para *T. cruzi*, segundo o protocolo proposto por Umezawa, et al. (1996) com modificações.^{136,137} Os quatro animais foram submetidos ao xenodiagnóstico clássico realizado segundo Rey (2001), e o isolamento do *T. cruzi* foi demonstrado em apenas dois, e pode estar associado à escassez do parasito no sangue periférico devido à provável forma crônica da doença. Foram os primeiros casos autóctones de cardiopatia chagásica em cães do Estado de Mato Grosso do Sul, com confirmação da presença de *T. cruzi*.¹³⁸ A presença de infecção natural nesses animais reabre a questão da importância do cão na epidemiologia da doença de Chagas e sugere um alerta aos veterinários para a existência dessa enfermidade.^{135,136}

Apesar de ser conhecido à natureza multisistêmica da infecção da DC e a variedade de sinais clínicos, em cães, o diagnóstico pode passar despercebido. A evidência de ritmos cardíacos anormais e insuficiência cardíaca congestiva, com disfunção ventricular direita, justifica investigação de miocardite chagásica.¹³⁶

5.4 Dados entomológicos

Flebotomíneos

As investigações entomológicas são importantes, e o seu objetivo é levantar as informações de caráter quantitativo e qualitativo sobre os flebotomíneos transmissores da LV. Do ponto de vista operacional, várias metodologias podem ser empregadas, tais como: coleta manual com tubo de sucção tipo Castro; coleta manual com capturador motorizado; coleta com armadilhas luminosas (modelo CDC ou similar); armadilhas com animais ou com feromônios²¹.

A quantidade desses insetos está relacionada com fatores ambientais, como a precipitação pluviométrica e presença de matéria orgânica, podendo aumentar frente à temperatura elevada².

A coleta de flebótomos, segundo o Ministério da Saúde, deve ser realizada em todos os setores ou localidades do município, utilizando-se de duas até dez armadilhas em cada setor/localidade. Estas armadilhas devem ser instaladas no peridomicílio. Os domicílios selecionados devem ser preferencialmente os sugestivos para a presença do vetor, com peridomicílio que possuam presença de plantas (árvores, arbustos), acúmulo de matéria orgânica, presença de animais domésticos (cães, galinhas, porcos, cavalos, cabritos, aves em geral, entre outros). Também as condições socioeconômicas e o tipo de moradia são critérios que podem ser levados em consideração para a seleção desses domicílios²¹.

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 mm⁴⁶.

O Laboratório de Entomologia do município de Três Lagoas, atualmente encontra-se defasado em insumos, inclusive armadilhas CDC para captura de flebotomíneos, o que tem dificultado as atividades de rotina. Diante desta situação, foram priorizados alguns bairros para monitorização e eventualmente realizar busca ativa quando notificado caso suspeito de LVH.

Na Tabela 11, observa-se a presença de *L. longipalpis* capturados em bairros das áreas priorizadas. Os flebotomíneos têm sido encontrados em sua maioria nos peridomicílios, mas em 2013 foram encontrados também no intradomicílio.

Os resultados da ocorrência da LVC incluindo pontos focais demonstram a necessidade de equipar o Laboratório de Entomologia do município a fim de auxiliar na tomada de decisão das ações de controle da doença.

Tabela 13: Número de *L. longipalpis* capturados segundo o sexo e Bairro, no município de Três Lagoas. 2013-2014.

Bairros - 2013	Intradomiciliar		Peridomiciliar	
	M	F	M	F
Santa Luzia	-	-	10	3
Santa Júlia	-	-	1	-
Colinos	-	-	2	1
Vila Nova	-	3	1	1
Vila Piloto	5	9	6	5
São Carlos	22	5	31	6
Santos Dumont	1	-	-	-
TOTAL	28	17	51	16
Bairros - 2014				
Santa Luzia	-	-	-	1
Santa Júlia	-	-	50	15
Colinos	-	-	22	7
Vila Nova	-	-	1	-
Vila Piloto	-	-	2	-
São Carlos	-	-	1	-
Santos Dumont	-	-	1	-
TOTAL	-	-	76	23

Fonte: Laboratório de Entomologia/TL

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, onde também foi encontrada a maior prevalência de casos humanos e caninos de LV, no período.¹³⁹ Tais dados evidenciaram o seu papel na transmissão local da leishmaniose.

Triatomíneos

Na regional de Saúde de Três Lagoas não existe o programa de controle da DC por não ser considerada região endêmica para esta doença. A pesquisa do vetor é passiva, ou seja, a notificação da presença de triatomíneos é feita pela população que, ao encontrar os espécimes encaminham ao laboratório de entomologia para a sua identificação, e conta com o apoio institucional. Esta metodologia é comprovadamente o método mais sensível para o monitoramento da infestação domiciliar, particularmente quando a densidade do vetor é baixa.

Para controlar a transmissão vetorial da DC deve-se levar em consideração o comportamento, hábitos das espécies de triatomíneos envolvidas e agrupá-los segundo sua participação na transmissão, pelo grau de antropofilia.¹³²

No Brasil, a espécie de maior dispersão é *T. sordida*, também predominante nas regiões de cerrado, onde se encontra a área do estudo. Em um estudo realizado por Almeida et al.¹⁴⁰ entre 2000 a 2004, no levantamento da fauna de triatomíneos e exames de infecção natural por *T. cruzi* no Estado de Mato Grosso do Sul, dos vetores coletados, observaram-se as seguintes espécies: *Triatoma sordida*, *Rhodnius neglectus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Triatoma williamsi*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma baratai*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma matogrossensis*, *Triatoma vandae*, *Rhodnius pictipes*, *Panstrongylus diasi* e *Panstrongylus guentheri*, no qual 12,4% dos indivíduos estavam presentes no intradomicílio e 87,6% no peridomicílio.

A transmissão do *T. cruzi* entre os animais silvestres ocorrem principalmente por via oral, por meio da alimentação de triatomíneos ou outros animais infectados no caso de animais carnívoros.^{141,142} Estudo realizado em ninhos de quatis no pantanal sul-mato-grossense foram coletados 36 triatomíneos, 17 *Triatoma sordida* e 16 *Rhodnius stali*, de diferentes estágios de desenvolvimento, com a presença das duas espécies em mesmo ninho ocasionalmente.¹³² Exames parasitológicos realizados nesses exemplares mostraram uma infecção de 66% pelas formas flageladas do *T. cruzi*, o que demonstra a importância desses triatomíneos no ciclo de transmissão desse parasita.^{132,143}

No período do estudo foram identificados seis espécimes de *T.sordida* no município de Três Lagoas, mas não estavam infectados.

5.5 Georreferenciamento

As ferramentas de Sistemas de Informação Geográfica (SIG) e o georreferenciamento possibilitam manipular o banco de dados para dar suporte a consultas que indicam características e podem definir padrões acerca das doenças. Na área da Saúde Coletiva, aplicar essas ferramentas permite ao gestor mapear doenças, avaliar riscos, planejar ações de saúde e avaliar redes de atenção à saúde²¹.

No 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.

A literatura aponta que as condições socioeconômicas, ambientais e hábitos de vida são fatores significativos na epidemiologia da leishmaniose visceral em áreas endêmicas. 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.¹⁴⁴

A coleta de lixo inadequada e ausência de rede de esgoto tornam o ambiente propício ao desenvolvimento de formas imaturas e à manutenção do vetor no ambiente.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸

Segundo Oliveira et al. (2006), ao estudarem a influência dos fatores de risco microambientais em Belo Horizonte, para LV urbana, concluiu-se que as características peridomiciliares e a presença de animais nas proximidades dos domicílios eram significativamente associadas ao quantitativo de casos de leishmaniose.¹⁴⁹

A LV é negligenciada em muitos municípios, principalmente onde 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 de constante vigilância em

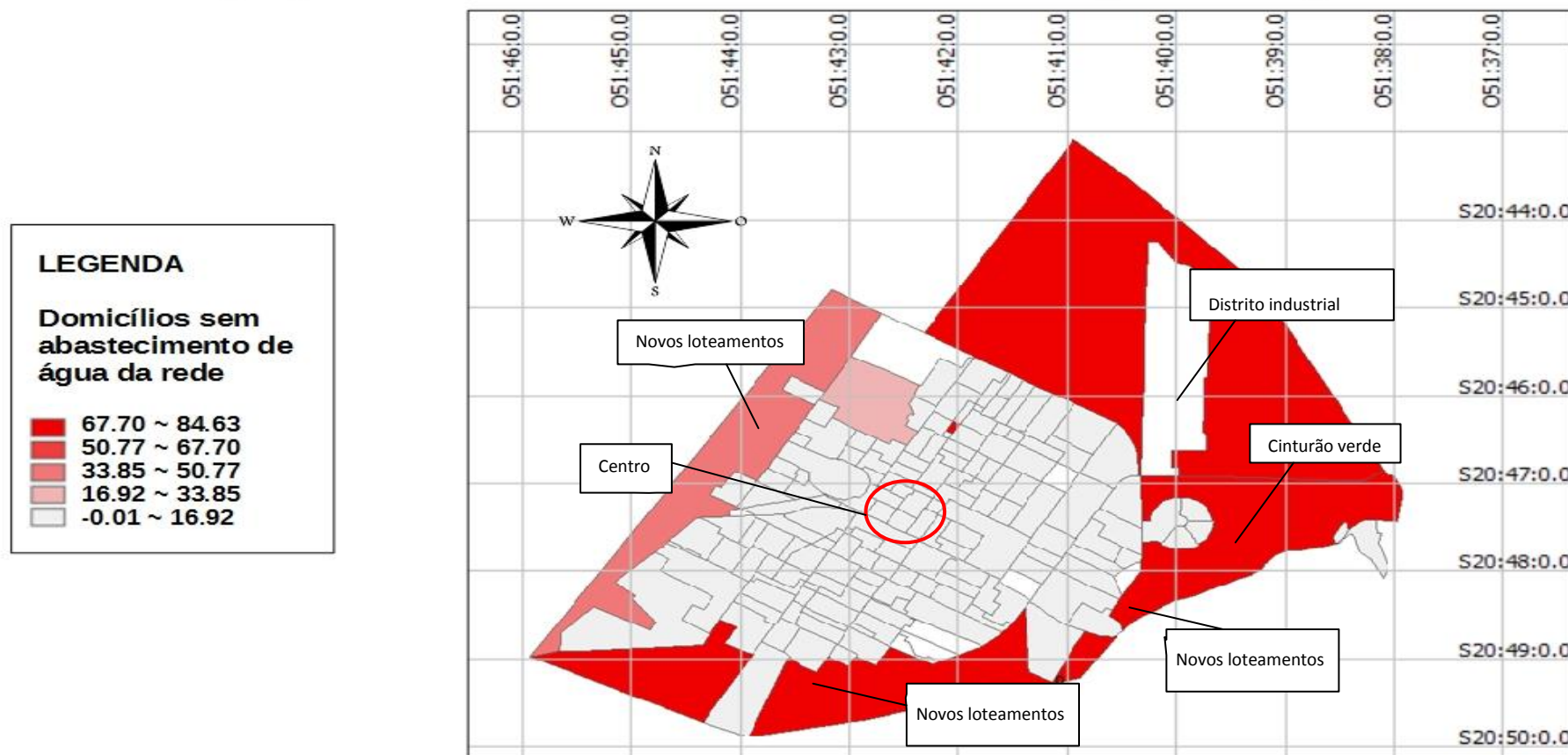
saúde e implementação de medidas de educação em saúde nas áreas endêmicas.¹⁵⁰

Em Três Lagoas a rede de abastecimento de água do município é terceirizada e oferece água tratada em quantidade para a maioria da população, são poucos os bairros que tem intermitência de água. No Mapa 10 pode ser verificado que, áreas menos povoadas, como o cinturão verde, área suburbana e os novos loteamentos, são as que proporcionalmente apresentam as maiores taxas sem abastecimento de água, pois concentram grandes áreas vazias com baixa densidade populacional.

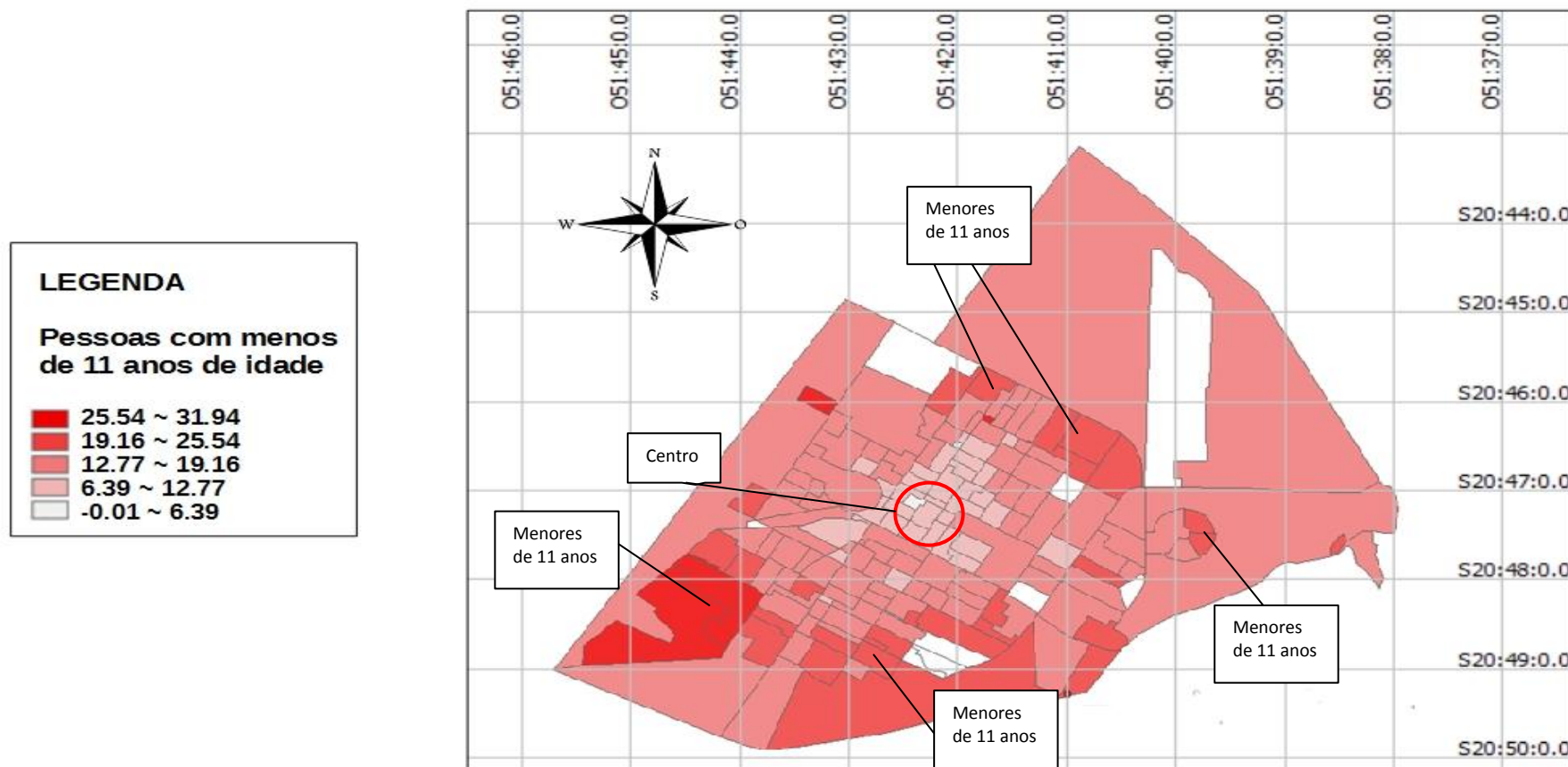
No Mapa 11, observa-se que a maior concentração de crianças menores de 11 anos encontra-se nos bairros da periferia do município, não coincidentemente é a área onde também se observa a concentração da população com a menor renda domiciliar mensal (Mapa 12). Considerando a leishmaniose, estas áreas são consideradas de vulnerabilidade para a doença uma vez que o ambiente característico e propício a ocorrência de LV é aquele de baixo nível socioeconômico, pobreza e promiscuidade.

É consenso que o processo desordenado de ocupação urbana resultou em condições precárias de vida e de destruição ambiental, e influenciou na emergência da doença no meio urbano, no qual por um lado o vetor *Lutzomyia longipalpis* se adaptou as condições dos peridomicílios de áreas depauperadas visto a abundância de matéria orgânica gerada por animais domésticos e as más condições sanitárias dos ambientes¹⁰.

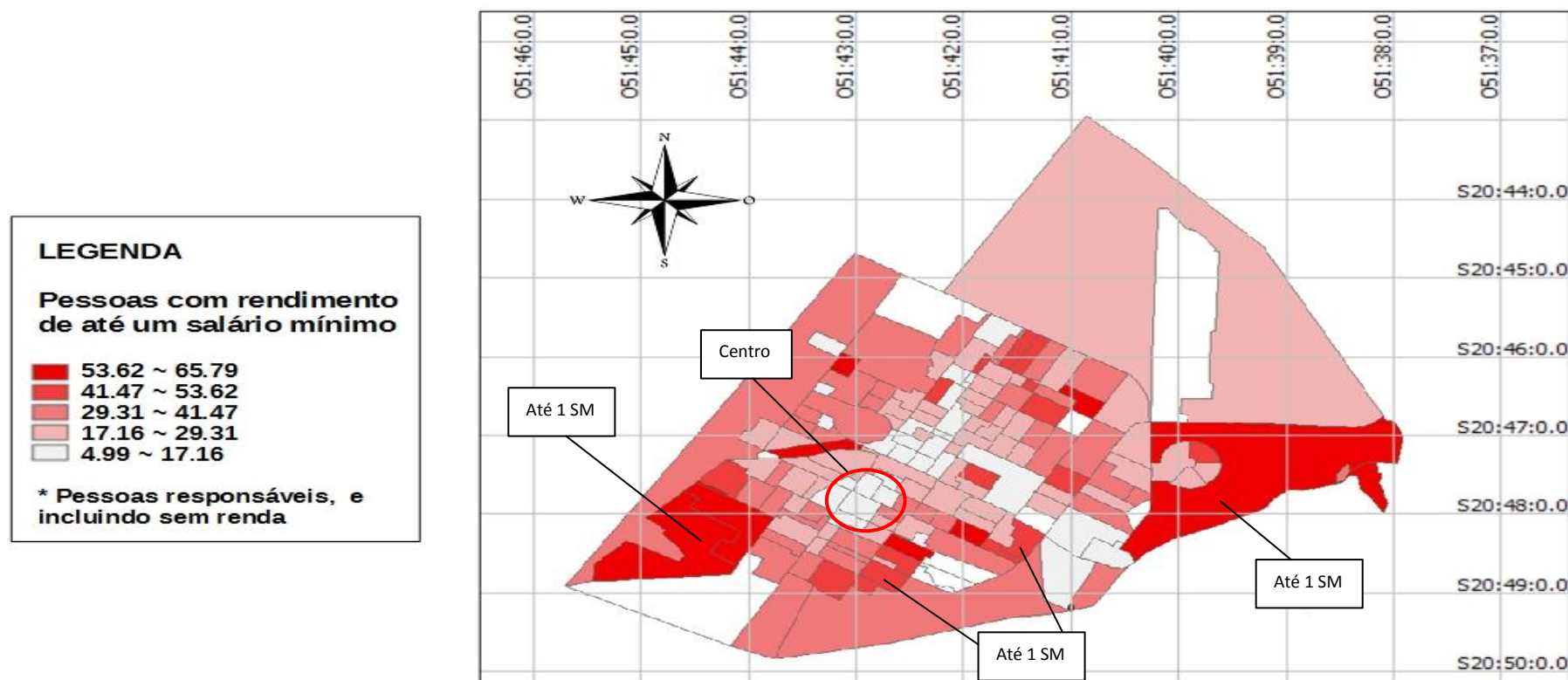
Mapa 10: Proporção dos domicílios sem abastecimento de água do sistema de distribuição. Três Lagoas - MS. 2010



Mapa 11: Proporção de pessoas com menos de 11 anos de idade. Três Lagoas - 2010



Mapa 12: Proporção de pessoas com rendimento de até um salário mínimo. Três Lagoas - MS. 2010



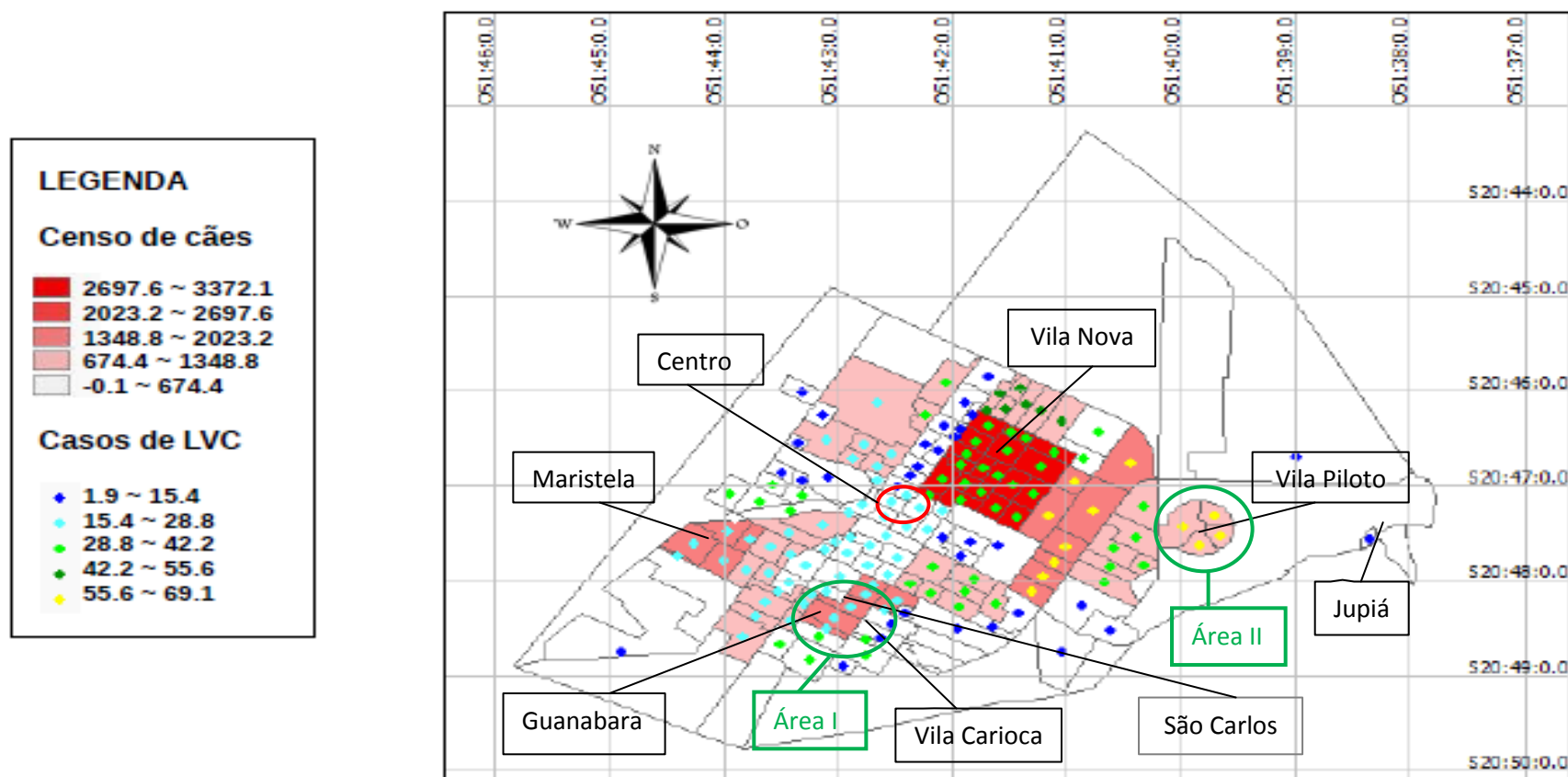
No Mapa 13 e 14, pela distribuição espacial no período do estudo, observa-se a densidade de cães obtida pelo censo canino e o número de casos de LVC de Três Lagoas em 2013 e 2014, caracterizando a endemicidade da doença na área urbana uma vez que existe a ocorrência de casos em todos os bairros do município.

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 sendo que os três últimos fizeram parte do Inquérito Sorológico Canino (ISC), Mapa 13 e 14.

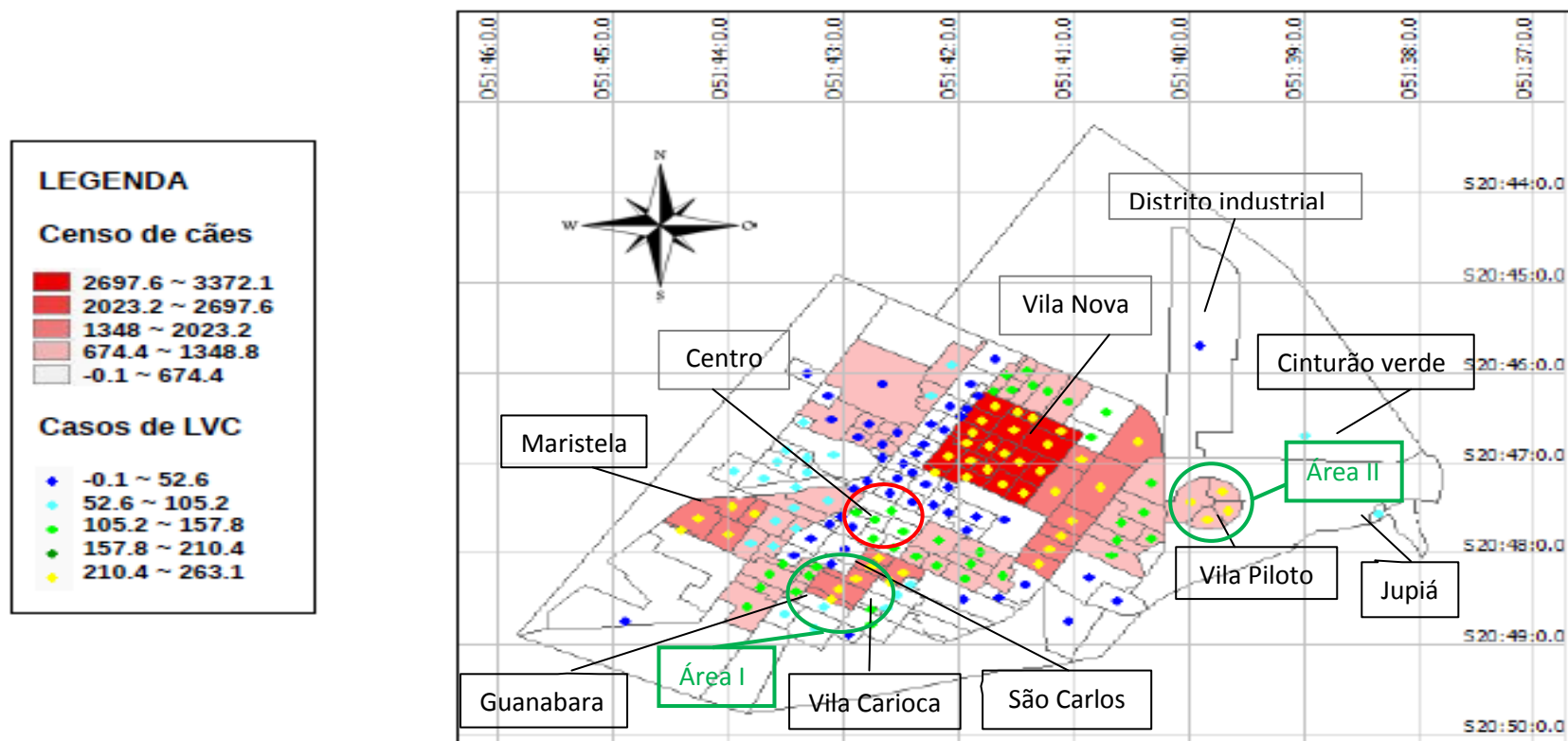
Esses bairros apresentam alta densidade populacional, ausência de esgotamento sanitário, baixo nível socioeconômico, presença de animais domésticos em sua maioria cães e gatos, muitos quintais com árvores frutíferas e outras espécies. Durante o inquérito verificou-se a presença de mais de um cão infectado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

Realizar estudos que monitorem a presença de cães, pelas ferramentas do georeferenciamento, 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.

Mapa 13: Densidade de cães pelo censo canino e casos de LVC. Três Lagoas - MS. 2013



Mapa 14: Densidade de cães pelo censo canino e casos de LVC. Três Lagoas - MS. 2014



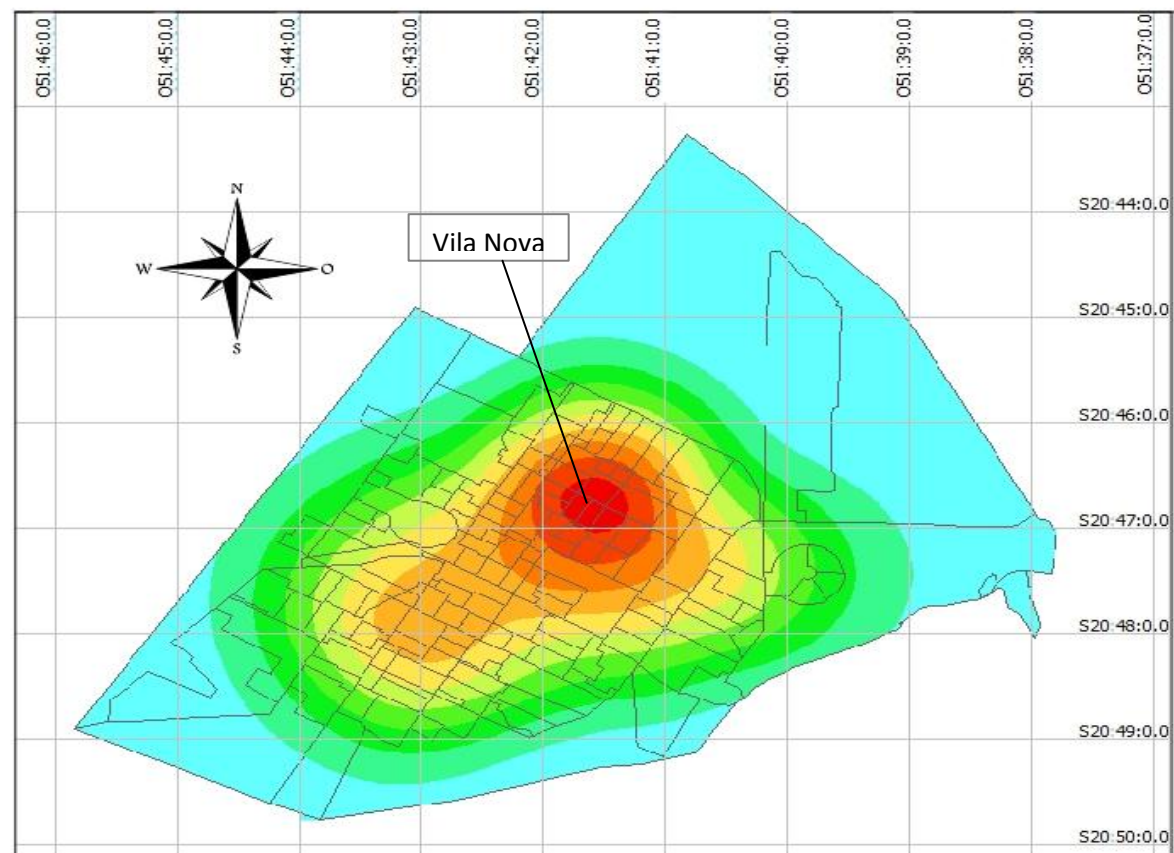
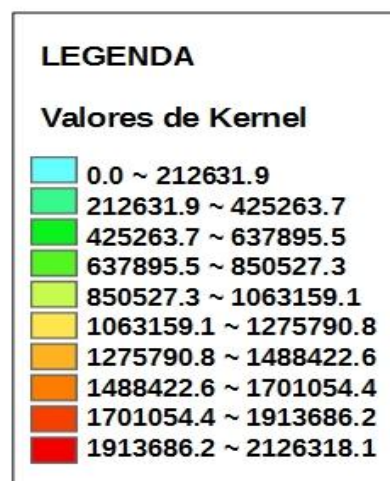
A epidemiologia, a partir de estudos em populações, preocupa-se em compreender e explicar o processo saúde-doença e procura identificar, na estrutura espacial e nas relações sociais deste espaço, as associações presentes na ocorrência da doença.⁶⁶

O Mapa de Kernel fornece uma visão geral da intensidade do processo em toda região do mapa em estudo, e foi utilizado para calcular a intensidade da LVC em cada ano (Mapa 15 e 16) proporcionando uma visão das áreas de dispersão ou aglomeração (*cluster*). O Mapa 15 apresenta a densidade de Kernel dos números de casos de LVC no ano de 2013, 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).

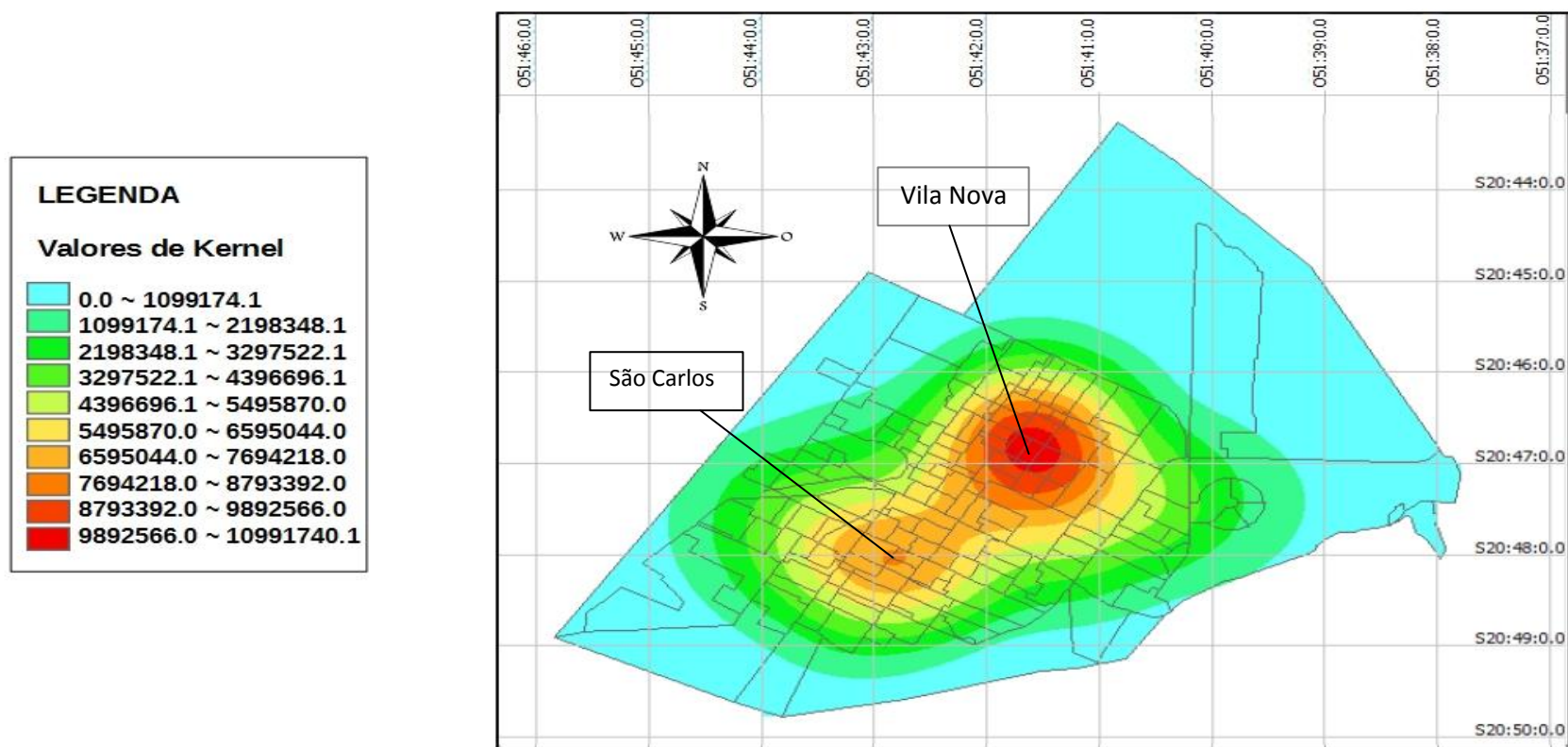
Ao analisar o Mapa 16 observa-se que em 2014 o *cluster* permanece no bairro Vila Nova (vermelho intenso), e observa-se *cluster* secundário de menor intensidade na região do São Carlos, demonstrando área de expansão, provavelmente identificado pelo ISC.

Conforme descrito na literatura, em alguns trabalhos pode-se observar que os principais focos da doença permanecem ao longo do tempo, mantendo o mesmo padrão.^{62,63} A existência dos mesmos focos ao longo dos anos, ainda que em número pequeno, permite sugerir que essas áreas representam problemas ao município.

Mapa 15: Densidade dos casos de LVC, em três Lagoas. 2013.



Mapa 16: Densidade de casos de LVC, em três Lagoas. 2014.



Nos Mapas 17 e 18, observa-se os casos caninos que foram reagente para LVC nas duas análises sorológicas, DPP® e ELISA, sintomáticos ou assintomáticos, e os cães com sinais clínicos da doença, porém sem resultados laboratoriais.

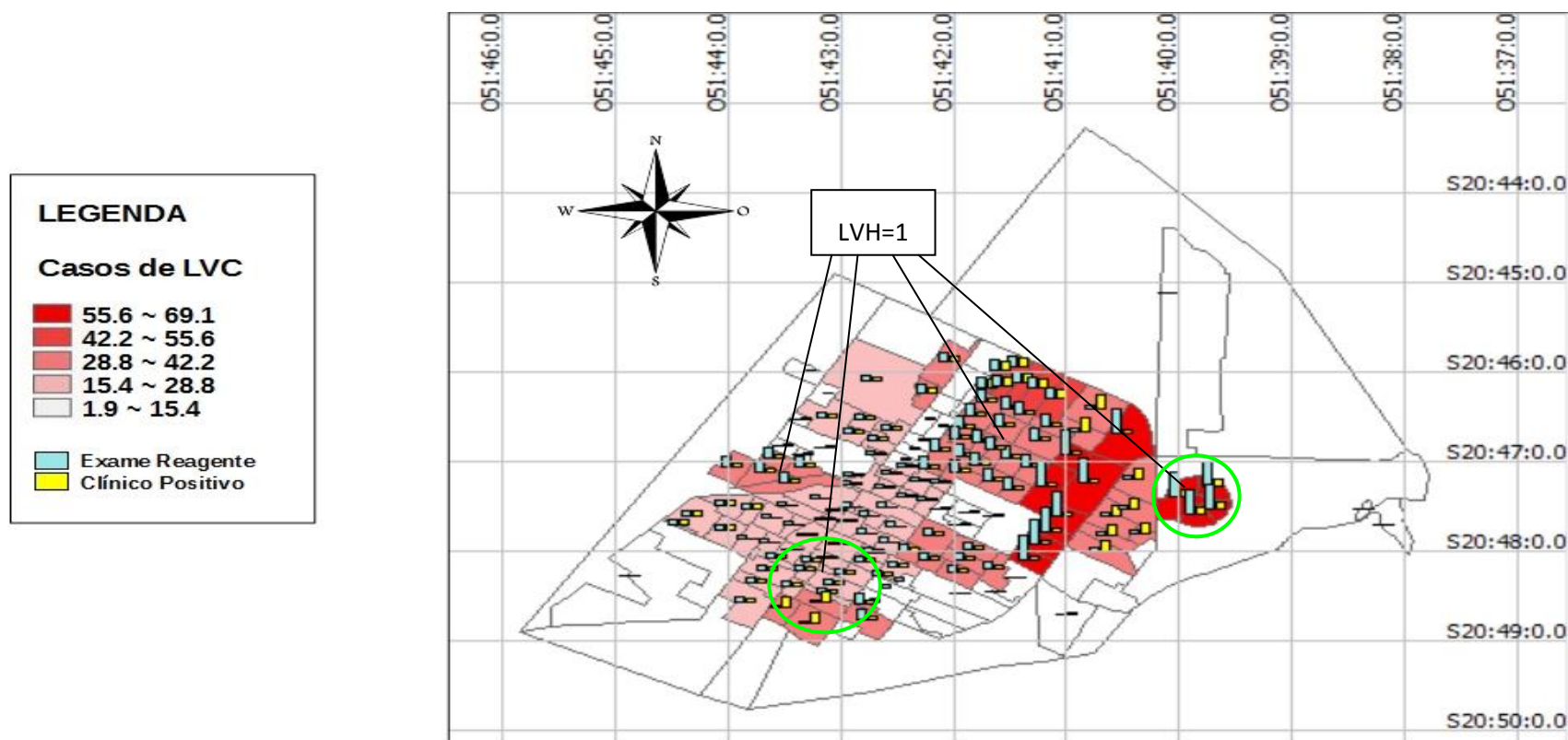
Em 2013 o município realizou 1706 exames, com 632 animais reagentes. Do total de casos eutanasiados (n=4559) estão incluídos os sintomáticos, sem exames realizados (Mapa 17). A maioria apresentava-se com diagnóstico laboratorial, de anos anteriores, do próprio CCZ ou clínicas privadas.

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, também muitos com diagnóstico de anos anteriores do CCZ ou de clínicas privadas (Mapa 18).

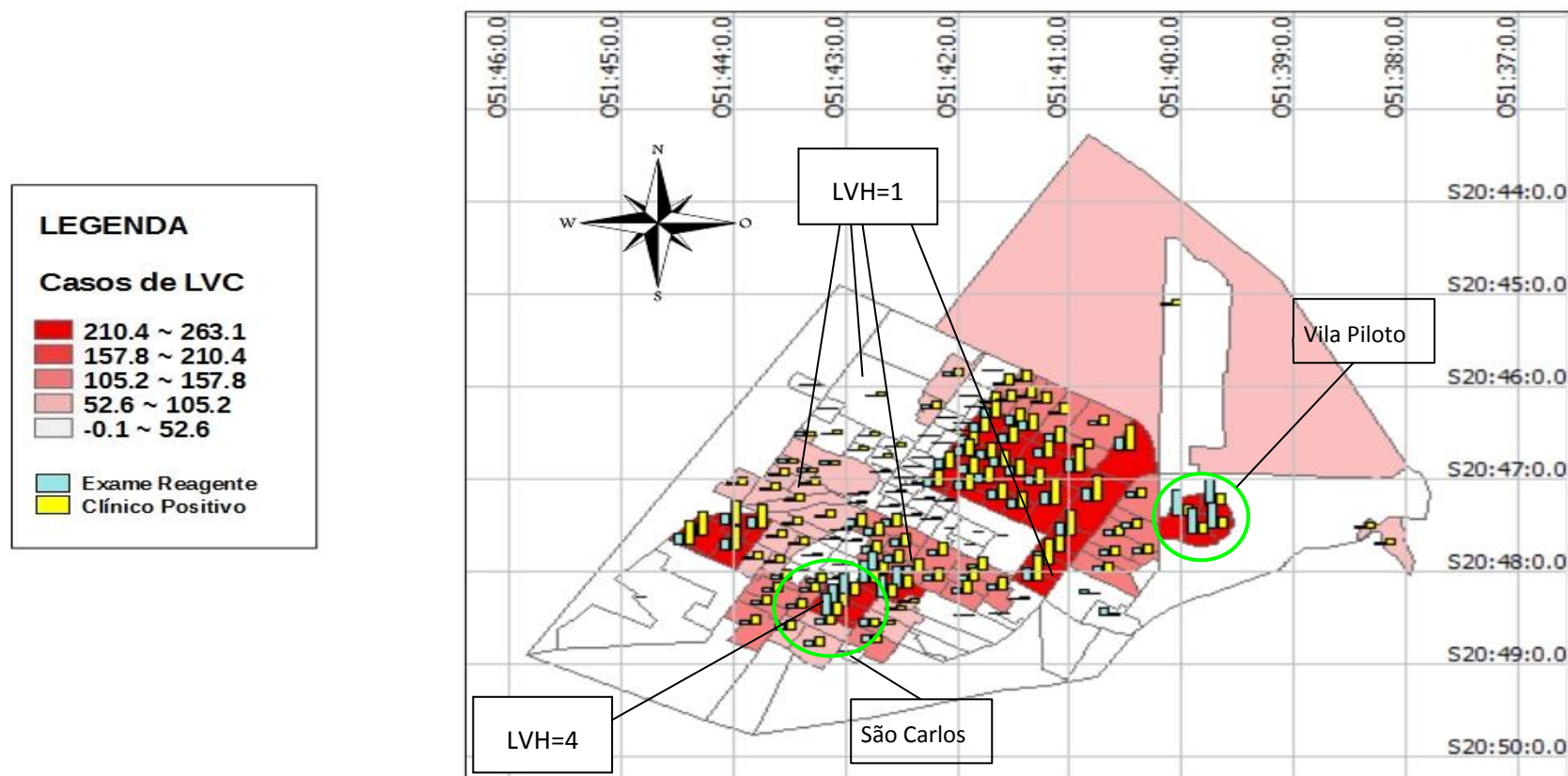
Considerando a gravidade da doença e as taxas de letalidade, qualquer registro, mesmo que canino, representa um importante problema de saúde que, se não controlado, pode colocar não somente a população de cães susceptíveis em risco, mas também a de humanos. Portanto controlar a doença na população canina é elementar para controle da LV como problema de saúde pública. Monitorar os casos de LVC e a população canina, bem como variáveis relacionadas, pode apontar algumas características importantes.

No estudo foi encontrada nas duas áreas do inquérito em 2014, alta positividade aos exames sorológicos e continuam se mantendo como área de transmissão de LVH, desde o início dos primeiros casos no município em 2000, demonstrando serem 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.

Mapa 17: Casos de LVH, e LVC segundo exame reagente e ou sinais clínicos da doença. Três Lagoas. 2013.



Mapa 18: Casos de LVH, e LVC segundo exame reagente e ou sinais clínicos da doença. Três Lagoas. 2014.



As medidas de prevalência, incidência, identificação de *cluster* e outras ferramentas são elementares para se trabalhar a interpretação de doenças. Com estas metodologias faz-se o mapeamento e é possível identificar padrões e estatísticas que compreendam o comportamento dos casos de LVC no tempo e no espaço.⁶⁶ Calcular a prevalência serve para avaliar a gravidade da LVC no município. Alta prevalência indica as áreas mais afetadas, e ao identificar a prevalência por bairros permite inferir onde há maior risco da doença e a necessidade de maiores estudos para o controle da doença.

Em 2013 os bairros com maior prevalência para LVC em Três Lagoas, segundo a Tabela 14 foram: Jardim Brasília, Vila Zuque, Guanabara e Santa Luzia. Já em 2014 a maior prevalência foi observada nos bairros: Jardim Brasília, Quinta da Lagoa, Jupiá e Bela Vista.

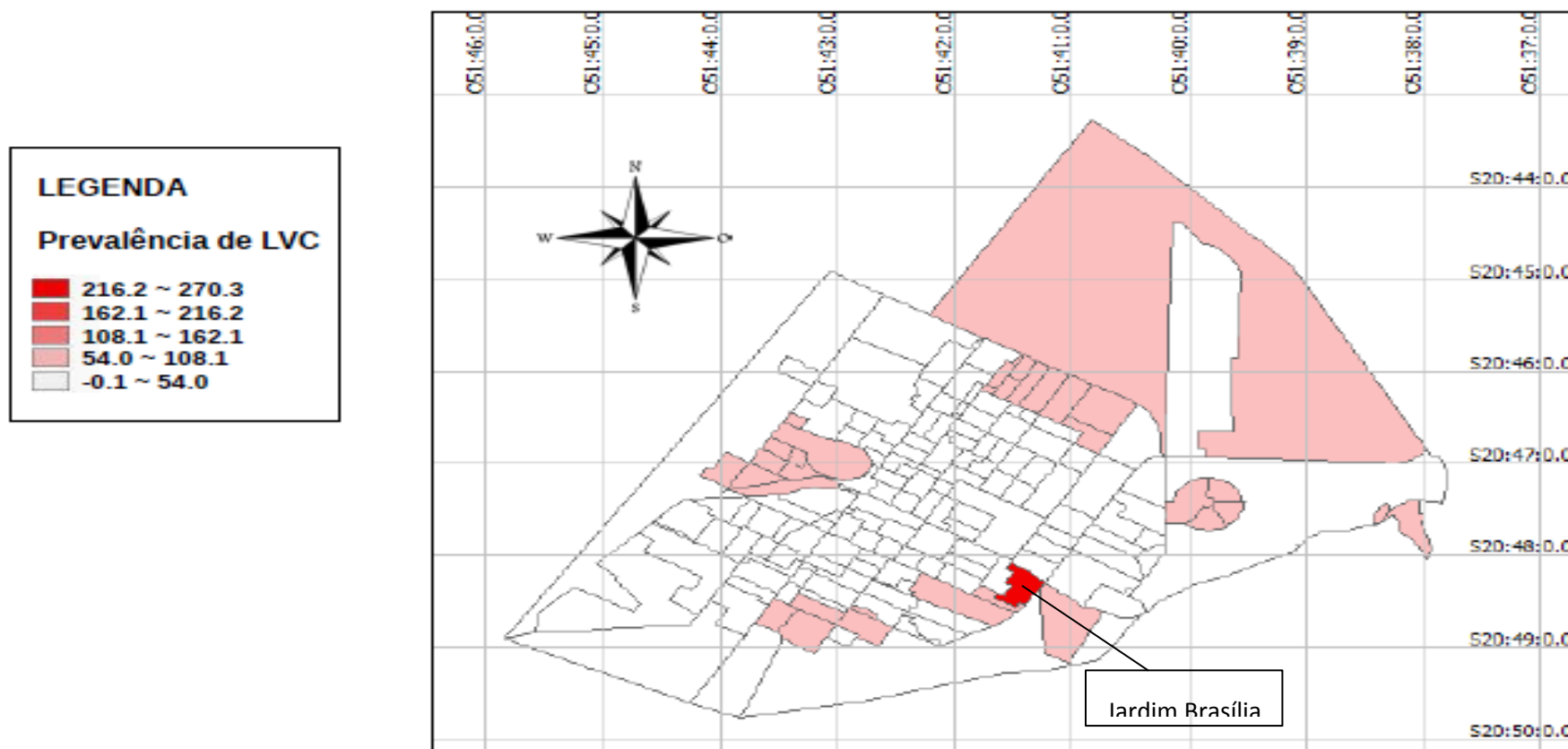
Tabela 14: Prevalência de Leishmaniose Visceral Canina (LVC), segundo os bairros. Três Lagoas (MS). 2013 e 2014.

Bairros	Coeficiente de prevalência/1000 cães	
	2013	2014
Jardim Brasília	270,2	729,7
Vila Zuque	101,4	-
Guanabara	76,7	-
Santa Luzia	73,5	-
Quinta da Lagoa	-	555.5
Jupiá	-	391.8
Bela Vista	-	323.4

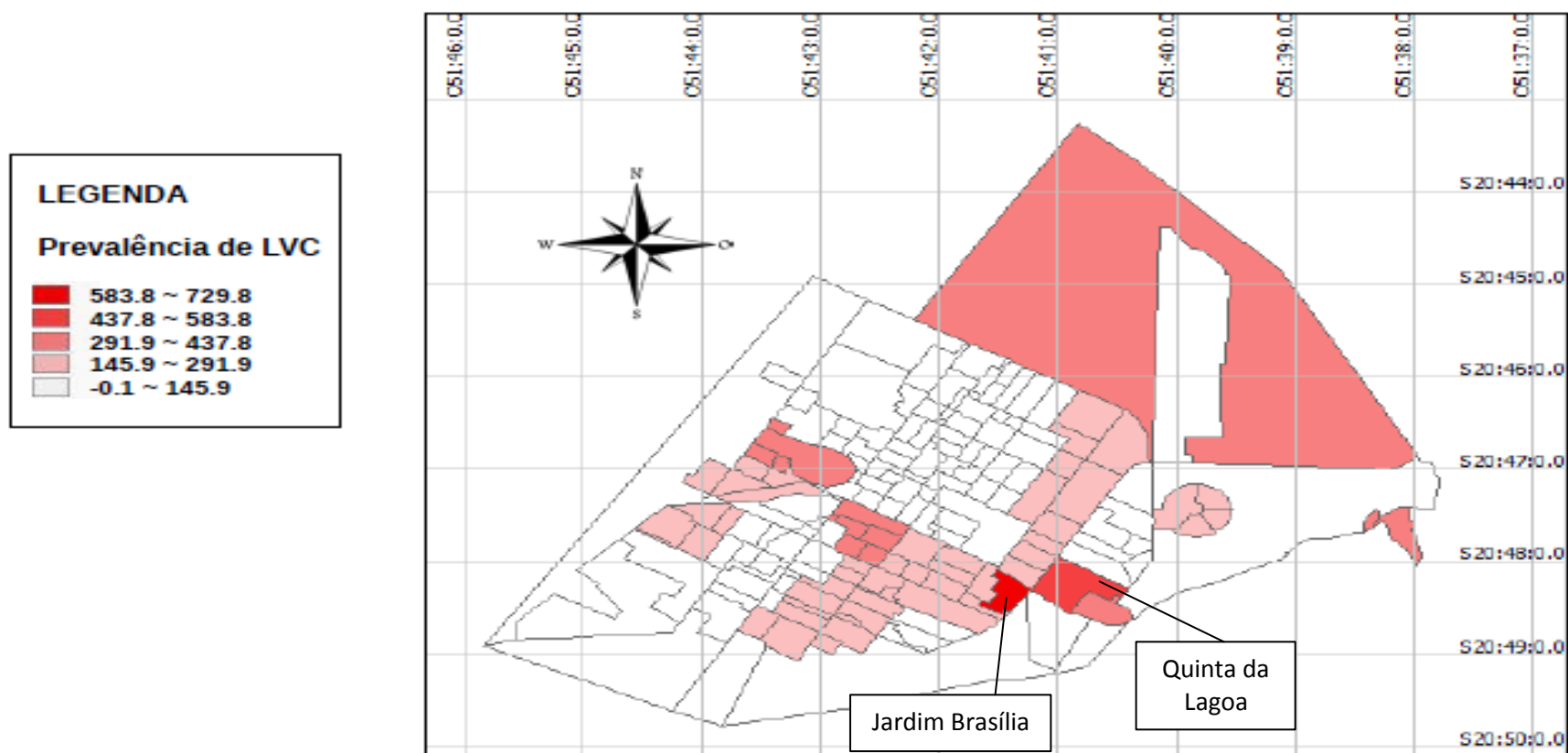
Fonte: CCZ/TL

Baseado na prevalência dos bairros e para refinar a análise espacial, utilizou-se a análise por *cluster*, (Mapas 19 e 20). Observa-se que, em 2013, só havia um *cluster*, Jardim Brasília. Já em 2014 passou a ter dois: Jardim Brasília e Quinta da Lagoa, que são áreas próximas. Em alguns trabalhos, descritos na literatura, pode-se observar que os principais focos da doença mantêm o mesmo padrão ao longo do tempo³².

Mapa 19: *Cluster* para a prevalência de LVC. 2013.



Mapa 20: *Cluster* para a prevalência de LVC. Três Lagoas. 2014.



A LVC é uma doença focal, influenciada por fatores ambientais, e a persistência dos mesmos focos ao longo dos anos, sugere a existência de áreas problemáticas ao município.

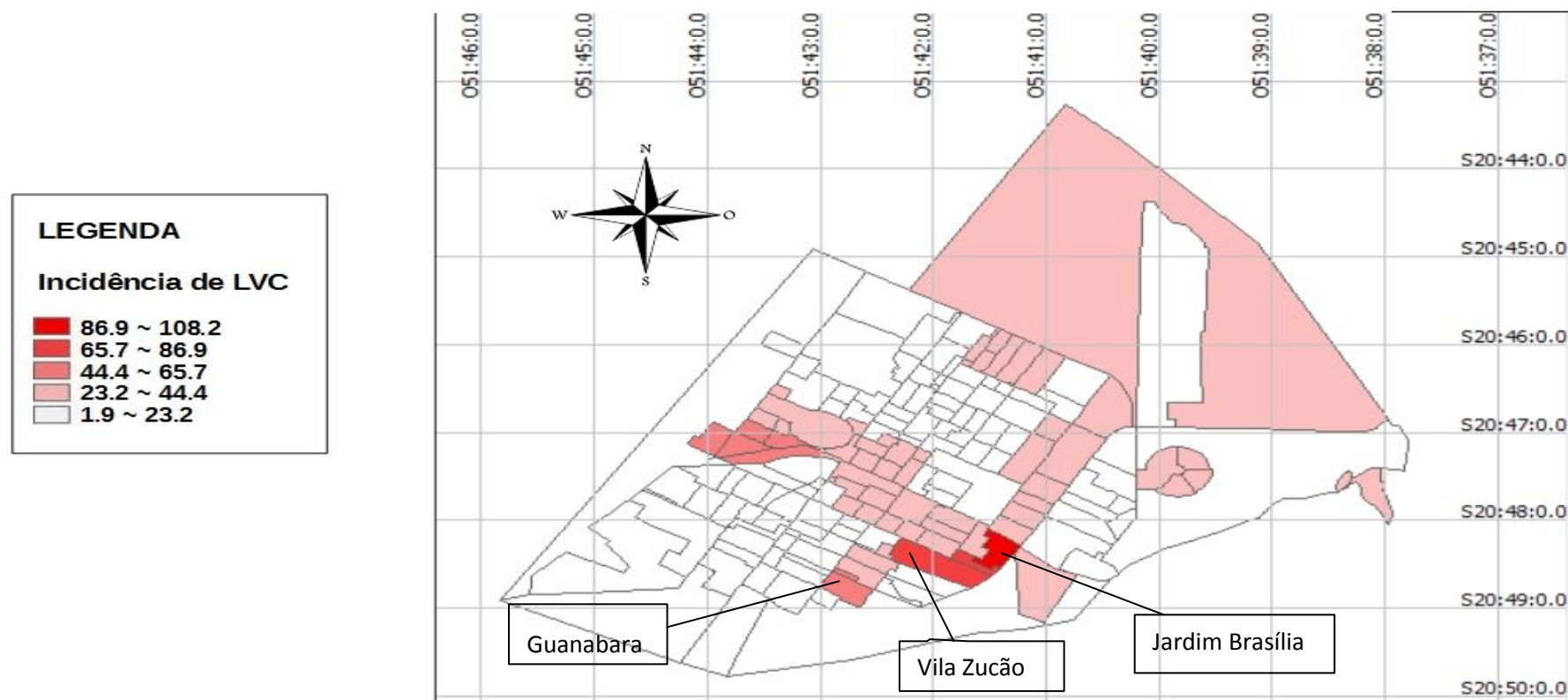
A incidência de casos, é o número de casos novos pelo número de cães existentes, denota a intensidade com que acontece uma doença na população e mede a frequência ou probabilidade de ocorrência de novos casos.¹

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) sendo que os dois últimos pertencem à área do inquérito do São Carlos, demonstrando mais uma vez que é uma área de risco para a doença (Mapa 13).

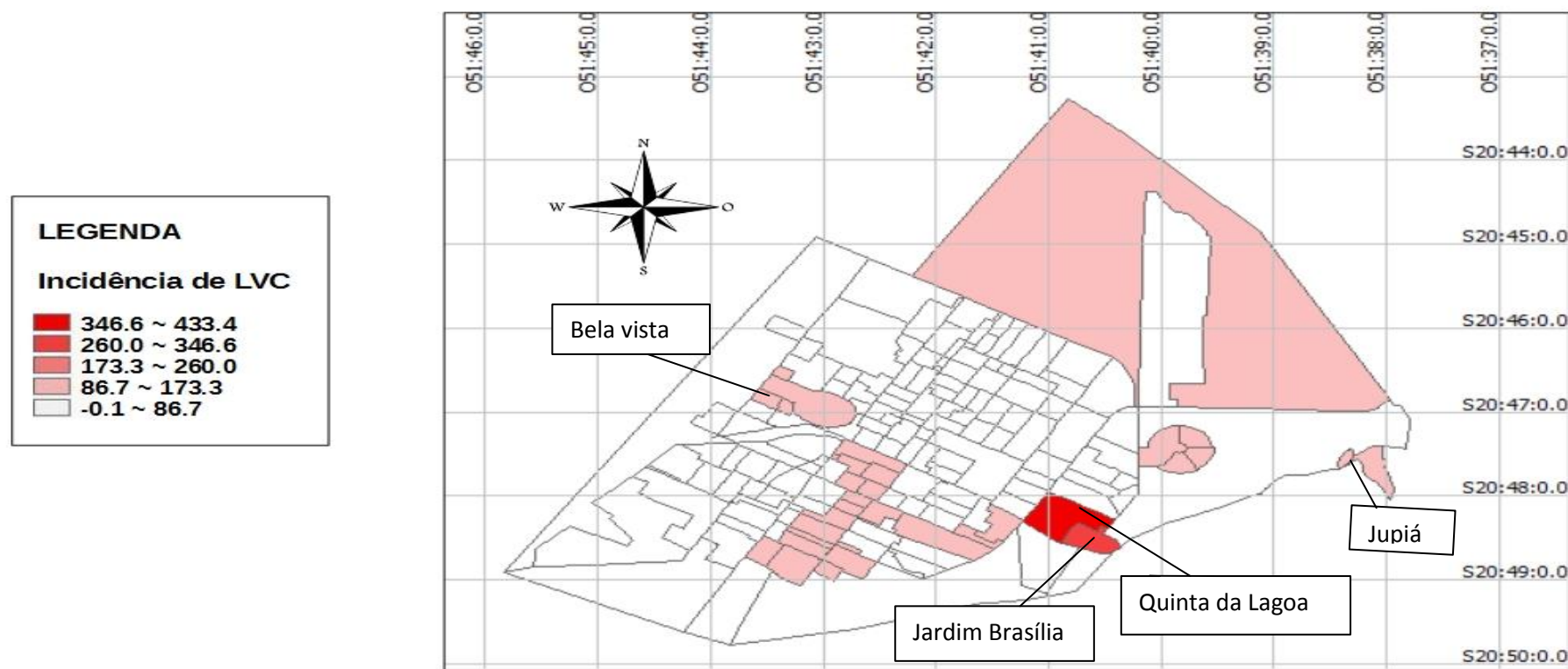
Em 2014 as maiores taxas de incidência registrada foram nos bairros: Quinta da Lagoa (433.3/1000 cães), Jardim Brasília (162.2/1000 cães), Bela Vista (154.2/1000 cães) e Jupiá (140.3/1000 cães) entre outros, demonstrando a necessidade de outros estudos para avaliação da expansão da doença com novas áreas de risco (Mapa 14).

O Jardim Brasília, por sua vez, merece destaque por manter-se como área de transmissão intensa por dois anos consecutivos, apontando a necessidade de intervenção e monitorização neste espaço.

Mapa 21: Distribuição de *Cluster* para a incidência de LVC. Três Lagoas. 2013.



Mapa 22: Distribuição de *Cluster* para a incidência de LVC. Três Lagoas. 2014.



CONCLUSÃO

- Em relação à infecção natural por *Leishmania* spp., confirmou-se nos canídeos domiciliados procedentes dos municípios do estudo, mas não foi confirmada com as amostras de sangue dos gambás por análises moleculares. A LVC se encontra ainda com concentração em alguns bairros de Três Lagoas, com expansão para novas áreas, e observa-se a expansão da LVC em Água Clara e Brasilândia.

- Em Três Lagoas, quanto às doenças em humanos, os casos de leishmaniose visceral humana persistem em áreas com transmissão da doença desde o início da epidemia no município.

- Em relação à infecção natural por *T.cruzi* não foram confirmadas nas amostras analisadas de sangue dos cães e gambás com as técnicas empregadas em nenhum dos municípios. Sugere-se que novos estudos devam ser realizados.

- A presença dos flebotomíneos, associada às condições ambientais da região é favorável à sua disseminação, bem como a transmissão da doença aos cães e ao homem.

- O uso do georreferenciamento para LVC, em Três Lagoas, possibilitou verificar as características da doença e padrões espaciais da distribuição da LVC no município de Três Lagoas, bem como subsídios para identificação de áreas com prioridade de intervenção para o controle da LVC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Brasil. Guia de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 8ª ed. Brasília. 2010; 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
2. Michalick MSM; Genaro O. Gênero *Leishmania*. In NEVES; et al. Parasitologia Humana. 11ª ed. Atheneu. São Paulo. 2004; p. 67-84.
3. Lana M; Tafuri WL. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In NEVES; et al. Parasitologia Humana. 11ª ed. Atheneu. São Paulo. 2004; p. 85-108.
4. Brasil. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. 2011; 78 p.: il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
5. Guerin PJ, Oliaro P, Shyam S, Boelaert M, Croft S, Desjeux P. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and proposed research and development agenda. *Lancet*. London. 2002; 2:494–501
6. França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*. Nova York. 2003;111(2-3):161-73.
7. Serrano ACM, Nunes CM, Savani ESM, Nicoletti SR, Bonello DFL, Vasconcelos RO, et al. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba-SP - relato de caso. *Clin Vet*. 2008;(76):36-40.
8. Eloy LJ; Lucheis SB. Hemoculture and Polymerase Chain Reaction Using Primers TCZ1/TCZ2 for the Diagnosis of Canine and Feline Trypanosomiasis. *Vet Sci*. 2012; 6p.
9. 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; 20:5.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. 2014; 812 p.
11. Petherick A. After years of neglect, Brazil takes aim at Chagas disease. *Focus on Brazilian Biomedicine*. *Nat Med* 2011; 17:1174.

* Segundo normas Vancouver: "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal" (International Committee of Medical Journal Editors, 1993).

12. Brenner Z; Andrade ZA; Barral-Neto M. Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2.ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 2000.

- 13.Nóbrega AA; Garcia MH; Tatto Erica; Obara MT; Costa E; Sobel J; Araujo, WN. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. *Em Infect Dis*. 2009; 15(4):653-5.
- 14.Souza-Lima RC; Barbosa MGV; Coura JR; Nascimento AS; Ferreira JMBB; Magalhães LK; Albuquerque BC; Araújo GANA; Guerra JAO. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(4):510-4.
- 15.Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. Boston. 2007; 357(10):1018-27.
- 16.Rassi Jr, A; Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*, London. 2010; 17;375(9723):1388-402.
- 17.Gurtler RE. Domestic dogs and cats as source of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*. 2007; 134(Pt 1):69-82.
- 18.Rosypal AC; Cortés-Vecino JA, Gennari SM, Dubey JP, Tidwell RR, Lindsay DS. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. *Vet Parasitol*. 2007; 149(3-4):172-7.
- 19.Medronho RA, Werneck GL. Técnicas de análise espacial em Saúde. In: Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL, editores. *Epidemiologia*. São Paulo: Atheneu; 2004; p.427-46.
- 20.Maia-Elkhoury, AN; Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saúde Publica*. 2008; 24(12):2941-7.
- 21.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*. 1998; 59(1):53-7.
- 22.Brasil. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. 2006; 120p.
- 23.Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol*. 1996; 14(5):417-23.
- 24.Boelaert M, Criel B, Leeuwenburg J, Van Damme W, Le Ray D, Van Der Stuyft P. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2000; 94(5):465-71.

25. Bern C, Chowdhury R. The epidemiology of visceral leishmaniasis in Bangladesh: prospects for improved control. *Indian J. Med. Res.* 2006; 123(3):275.
26. WHO. Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. World Health Organization. Geneva. *Who Tech. Rep. Ser.* 2010; 949:22-6.
27. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet J-P, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21(2):334–59.
28. Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J.* 2008; 175:45-52.
29. Del Giudice P, Marty P, Lacour JP, Perrin C, Pratlong F, Haas H, et al. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: case reports and literature review. *Arch. Dermatol.* 1998; 134(2):193.
30. BenSaid M, Guerbouj S, Saghrouni F, Fathallah-Mili A, Guizani I. Occurrence of *Leishmania infantum* cutaneous leishmaniasis in central Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006; 100(6):521-6.
31. Svobodová M, Alten B, Zídková L, Dvorák V, Hlavacková J, Mysková J, Seblová V, Kasap OE, Belen A, Votýpka J, Volf P. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi* *Int. J. Parasitol.* 2009; 39(2):25-6.
32. SUCEN. Relatório Leishmaniose Visceral. Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo. 2006. [Acesso 2014, set 12]. Disponível em www.sucen.sp.gov.br.
33. Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr. FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera:Psichodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1997; 378-90.
34. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998; 12:315-7.
35. Rangel, EF, Lainson, R (org.). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2003. 367 p.
36. Paranhos-Silva M, FreitasLAR, Santos WC, Grimaldi GJr, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveirados-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 55:39-44.
37. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2004; 7(3):338-49.

38.Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saúde Pública*. 2008; 24(12):2959-63.

39.Alvar J, et al. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004; 57:1-88.

40.Acedo Sánchez C, Martín Sánchez J, Vélez Bernal ID, Sanchís Marín MC, Louassini M, Maldonado JA & Morillas Márquez F. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain). *Inter J Parasit*. 1996; 25:303-10.

41.Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad. Saúde Pública*. 2008; 24(12):2937-40.

42.Dias JCP. Epidemiology of Chagas Disease. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME & Rassi A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT São Paulo. 1992; p. 49-80.

43.Nussenzweig, V. & Goble, F. C. Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Exp. Parasit*. 1966; 18:224-230.

44.Souza AI. Estudo clínico da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães residentes em uma área rural de Mato Grosso do Sul, Brasil. [Dissertação]. Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias: Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho". Jaboticabal. 2007.

45.Rey, L. Parasitologia. 3. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2001; 856 p.

46.Dias JCP & Coura JR. Epidemiologia. In: J. C. P. Dias & J. R. Coura, org. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1997. p. 33-66.

47.DIAS JCP. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2006; 28(2):83-4.

48.Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis. 2012;54(6):845-52.

49.ANVISA. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico (35). Brasília: ANVISA; 2008.

50.Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001;1:472-481.

52.Gonzales-Perdomo M; Romero P. & Goldenberg S. cAMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Experimental Parasit*. 1988;66:205-212.

- 53.Vinhaes MC; Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. Cadernos de Saúde Pública16. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. p.7-12.
- 54.Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. Brit. Med. J. 2003;28:1444-48.
- 55.Barcellos C; Ramalho WM, Gracie R, Magalhães MAFM, Fontes MP, Skaba D. Georreferenciamento de dados de saúde na escala submunicipal: algumas experiências no Brasil. Epidemiol. Serv. Saúde. Brasília, 2008; 17(1):59-70.
- 56.Baneth G; Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends in Parasitology. 2008; v. 24, n. 7, p. 324-330.
- 57.Davis, C, Câmara, G. Introdução. São José dos Campos, 2001. [Acesso 2014, out 03].Disponível em: <<http://www.dpi.inpe.br/gilberto/livro>> Acesso em: 03/10/2013.
- 58.Medronho RA, Werneck GL. Técnicas de análise espacial em Saúde. In: Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL, editores. Epidemiologia. São Paulo: Atheneu; 2004. p.427-46.
- 59.Medronho RA. Geoprocessamento e Saúde: uma nova abordagem do espaço no processo saúde doença. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/CICT/NECT; 1995.
- 60.Bavia, ME, Ribeiro FS, Martins MS, Cardim LL, Silva MMN, Carneiro DDMT. Geotecnologias na identificação de fatores ambientais relacionados à ocorrência da Leishmaniose Visceral Americana em Conde, Bahia, Brasil. Rev. Bras. Saúde Prod. An., Salvador. 2011;12(4):949-960.
- 61.Carvalho MS, Pina MF, Santos SM. Conceitos básicos de sistemas de informação geográfica e cartografia aplicados à saúde. 20ed. Brasília: Organização Pan-Americana de Saúde; 2000.122p.
- 62.Tavares L, Tavares E. Incidência, Distribuição Geográfica e Aspectos Ambientais das Áreas Endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. Aracaju: Fundação Nacional de Saúde, 1999. [Acesso 2014, set 25]. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br>>.
- 63.Oliveira CDL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. Cad. Saúde Pública. 2001;17(12):1231-9
- 64.Furlan MBG. Epidemia de Leishmaniose Visceral no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. [Dissertação]. Mestrado Profissional. Instituto de Saúde coletiva. Universidade Federal da Bahia. 2008.

65. Paulan S de C, Silva HR, Lima EACF, Flores EF, Tachibana VM, Kanda CZ, Noronha Junior ACF, Dobre PR. Spatial distribution of canine visceral leishmaniasis in ilha solteira, São Paulo, Brazil. Rev. de Eng. Agríc., Jaboticabal. 2012;32(4):765-74.

66. Brasil. Abordagens espaciais em saúde pública. Ministério da Saúde, 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).

67. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2015. [Acesso 2015, jul 22]. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br>.

68. SEPLAN. Atlas Multirreferencial. Secretaria de Planejamento e Coordenação Geral. Fundação IBGE, 1990.

69. Água Clara. Prefeitura municipal de Água Clara. 2014. [Acesso 2015 jul 20]. Disponível em: www.aguaclara.ms.gov.br/site/pontencialidades

70. Costa Neto, PL. O. Estatística. São Paulo: Edgard Blücher, 1977.

71. Reis JC. Estatística Aplicada à Pesquisa em Ciência Veterinária. 1. ed. Olinda: JCR, 2003.

72. Tenório MS. Avaliação de técnica sorológica para Leishmaniose Visceral e doença de Chagas em animais silvestres e identificação molecular. [Tese] Faculdade de Medicina de Botucatu. Programa: Doenças Tropicais. UNESP. Botucatu. 2015

73. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosomacruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1966;8:227-234.

74. 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). Braz J Vet Res An Sci. São Paulo. 2009;46(3):18-7.

75. Bio-Manguinhos. TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina. Teste Rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para Leishmania. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro. 2011.

76. Bio-Manguinhos. EIE- Leishmaniose Visceral Canina. Ensaio Imunoenzimático para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, 2011.

77. El Tai N, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand

conformation polymorphisms (sspc) and sequencing. Transac of the Roy Soc of Trop Med Hyg. 2000; 94:1-5.

78.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. Jabuticabal. 2011;20(1):42-8.

79.Garin YJ, Meneceur P, Pratlong F, Dedet J-P, Derouin F, Lorenzo F. A2 gene of Old World Cutaneous *Leishmania* is a single highly conserved functional gene. BMC Infect Dis. 2005;5:18.

80.Pereira EFA. Variabilidade genética e diagnóstico molecular da *Leishmania spp.* pelas técnicas de RAPD e PCR no estado do Paraná e casos importados. [Dissertação]. Mestrado em Ciências Biológicas: Universidade Federal do Paraná, Curitiba; 2005.

81.Ikonomopoulos J; kokotas S; Gazouli M; Zavras A; Stoitsiou M; Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniosis in Dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Vet Parasitol. 2003;113:99-103.

82.Virreira M; et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg. 2003;68(5):574-82.

83.Corte MD, Gonçalves JC, Silva CS et al. Análise da concordância interobservadores em exames de Papanicolaou. NewLab, Ed 80. 2007

84.Beghetto MG, Luft VC, Mello ED, Polanczyk CA. Avaliação nutricional: descrição da concordância entre avaliadores. Rev Bras Epidemiol 2007;10:506-16.

85. Shrout PE. Measurement reliability and agreement in psychiatry. Statistical Methods in Medical Research. 1998;7:301-17.

86.Hendrick R. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press. 1987. p.703-729.

87.Maia C; Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet Parasitol. 2008;197(3-4):498-503.

88.Cardim, MFM; Rodas, LAC; Dibo, MR; Guirado, MM; Oliveira, AM; Chiaravalloti Neto, F. Introdução e expansão da Leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. Rev. Saúde Pública. São Paulo. 2013;47(4):1-9

89.Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E. Guidelines for diagnosis and

clinical classification of leishmaniasis in dogs. J Am Vet Med Assoc. 2010;236(11):1184–1191

90.Laurenti MD, Rossi CN, Matta V, Marcondes LM. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. Vet Parasitol. 2013; 196(3-4):296-300.

91.Schubach EYP. Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro. [Dissertação] Universidade de Brasília, Brasília. 2011.

92.Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF, Schallig HDFH, Brazil RP. Diagnosis of canine Leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, by parasite, antibody and DNA detection assays. Vet Res Commun. 2006;30:637-43.

93.Ferreira EC, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CM. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Vet Parasitol 2007;146(3-4):235-41.

94.Brasil. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde. 2011. [Acesso 2015 jul 20] Disponível em: www.saude.gov.br/svs.

95.Costa RT, França JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro, O, CampoS-Neto, A. Standardization of a rapid immununochromatographic test with the recombinant antigens k39 and k26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2003; 97:678-82.

96.Reithinger, R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies, CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. J Clin Micr. 2002;40(7):2352-56.

97.Badaró R; Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG. rk39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. J Infect Dis. 1996; 173(3):758-61.

98.Scalone A, de Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Vet Parasitol. 2002;104:275-85.

99.Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America. A systematic review. PLoS. Negl. Trop. Dis. 2010;4(1):1-17.

100. Porrozzi R, Costa MVS, da Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, Santos CD dos, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi Jr G. Comparative evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays based on crude and recombinant Leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vac Immunol*. 2007;14(5):544-8.
101. Pedras MJ, Viana LG, Oliveira EJDE, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Trop Med and Hyg*. 2008;102(2):172-8.
102. Figueiredo FB, Madeira MF, Menezes RC, Pacheco RS, Pires MQ, Furtado MC, Pinto AG, Schubach TMP. Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniosis. *The Vet J*. 2010;186(1):123-4.
103. Silva DA, Madeira MF, Abrantes TR, Barbosa Filho CJL, Figueiredo FB. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet J* 2013;195(2):252-3.
104. Arruda MM, Figueiredo FB, Cardoso FA, Hiamamoto RM, Brazuna JCM et al. Validity and reliability of enzyme immunoassays Using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Plos One*. 2013;8(7):e69988.
105. Lachaud L; Hammami SM, Chabbert E. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2002. 40(1):210-15.
106. Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;98(1):12-17.
107. Ordeix L, Solano-Galleg, LAIA, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet Dermatol* 2005;16(3):187-191.
108. Santos JM; Dantas-Torres F, Mattos MR, Lino FR, Andrade LS, Souza RC, Brito FL, Brito ME, Brandão-Filho SP, Simões-Mattos L. Prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(1):41-5.
109. Faria, A. R.; Andrade, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amaz. Sau. Minas Gerais*. 2012;3(2):47-57.
110. Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol*. 2001; 99:105-11.

- 111.Manna L; Vitale F, Reale S, Caracappa A, Pavone LM. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2004; 125(3-4):251-62.
- 112.Reale S, Maxia L, Vitale F, Glosriosos NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2931-35.
- 113.Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M, Ramos JA, Fondevila D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci* 1988;44:194-6.
- 114.Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res.* 2012; 110:1065-78.
- 115.Cruz I, Nieto Javier, Moreno Javier, Cañavate Carmen, et al. *Leishmania/HIV* co-infections in the second decade. *Indian Journal of Medical Research, New Delhi.* 2006;123:357-88.
- 116.Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis, New York.* 2008;8:191-9.
- 117.Alam MZ, Shamsuzzaman AK, Kuhls K, Schonian G. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. *Trop Med Int Health.* 2009;14(5):499-503.
- 118.Silva MAL, Medeiros RA; Brandão-Filho S; Melo FL; Medeiros Z. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Rev Eletrônica de Farmácia.* 2010; 7:1-15.
- 119.Antonialli SAC. Ecoepidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana e sua distribuição espacial no estado de Mato Grosso do Sul 1994 – 2003. [Tese]. Ciências pela Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria do Estado de São Paulo. 2006.
- 120.Ewers AT, Rizzo LV, Filho JK. *Imunologia e envelhecimento.* Einstein. 2008; 6 (Supl 1):13-20.
- 121.Botelho ACA, Natal D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(5):503-8.
- 122.Alves MCGP; Matos MR, Reichmann ML, Dominguez MH. Dimensionamento da população de cães e gatos do interior do Estado de São Paulo. *Rev. de Saúde Pública, São Paulo.* 2005;39(6): 891-7
- 123.Julião FS, Souza BMPS, Freitas DS, Oliveira LS, Larangeira DF, Dias-Lima AG, Souza VMM, Barrouin-Melo SM, Moreira Jr ED, Paule BJA, Franke CR.

Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. *Pesq. Vet. Bras.* 2007; 27(8):319-24.

124. Palatnik-de-Sousa CB, Batista-de-Melo LM, Borja-Cabrera GP, Palatnik M, Lavor CC. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model: impact on the incidence of the canine and human disease. *Anais Acad. Bras. Ciênc.* 2004;76(3):583-93.

125. Moreira ED Jr, Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes CL. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol.* 2004;122(4):245-52.

126. Costa CHN, Tapety CMM, Werneck, GL. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(4):415-19.

127. Camargo ME, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC. Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1984;26:192-204.

128. Borges-Pereira J, Zauza PL, Galhardo MC, Nogueira JS, Pereira GRL, Cunha RV. Doença de Chagas na população urbana do Distrito Sanitário de Rio Verde, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34(5): 459-466.

129. Gaúna LA. Mapeamento da Doença de Chagas no Município de Porto Murtinho-MS. *Arte e Ciência.* 2011.

130. Soares RPP, Santoro MM. α -Glycerophosphate Dehydrogenase Activity in Flight Muscles of Triatomine Bugs *Panstrongylus megistus* and *Triatoma sordida*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2000. p.773-775.

131. Dias JCP, Prata A, Schofield CJ. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2002;35(6):669-78.

132. Santos FM. Avaliação de triatomíneos no pantanal Sul-matogrossense, Corumbá/MS. [Dissertação]. Programa Ciências ambientais e sustentabilidade agropecuária: Universidade Católica Dom Bosco. 2014.

133. Camacho AA, ALVES RO. Cardiopatia chagásica em caninos. In: Belerian, G; et al. Afecciones cardiovasculares em pequenos animais. Interbook. São Paulo. 2007;38(5):1351-56.

134. Montenegro VM; Jiménez M, Pinto Dias JC, Zeledón R. Chagas disease in dog dogs from endemic areas of Costa Rica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2002; p.491-494.

135. Lucheis SB, Da Silva AV, Araújo JR. JP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic

Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 2005;11(4):492-509.

136. Souza AI; Paulino-Junior D, Gonçalves SM, Camacho AA. Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. Cienc. Rural. Santa Maria. 2008; vol.38 n.5, p.1351-1356.

137. Umezawa ES. Immunoblot assay using excretes-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol. 1996; 34(9):2143-2147.

138. REY, L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: REY, L. Parasitologia. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2001. 856p.

139. Oliveira GMG; Figueiró Filho EA, Andrade GMC, Araújo L A, Oliveira MLG, Cunha RV. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. 2010;54:304-31.

140. Almeida PS, Gonçalves GMA, Minzão LD, Larson RVG, Cristaldo LCM, Ceretti Júnior W, Obara MT, Barata, JMS. Ocorrência de *Psammolestes coreodes* Bergroth, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) no Estado de Mato Grosso do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008;41(5):546-546.

141. Herrera HM, Rocha FL, Lisboa CV, Rademaker V, Mourão GM, Jansen AM. Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brasil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2011;105:380-87.

142. Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Alves-Martin MF, Paixão MS, Rodrigues MV, Starke-Buzetti WA, Araújo Junior JP, Lucheis SB. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. Vet parasitol. 2014;203(1-2):203-6.

143. Alves, F.M.. A complexidade, multifatorialidade e não linearidade da rede de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (*Trypanosomatida: Trypanosomatidae*) em quatis (*Carnivora: Procyonidae: Nasua nasua*) de vida livre do Pantanal/MS, um estudo longitudinal. [Dissertação]. Pós-Graduação em Medicina Tropical: Fiocruz. Rio de Janeiro, 2013.

144. Borges, BKA. Fatores de Risco para Leishmaniose Visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais. [Dissertação]. Medicina Veterinária: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. 2009.

145. Cerbino-Neto J; Werneck GL; Costa CHN. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. Cad Saúde Pública. 2009;25(7):1543-51.

- 146.Almeida ABPF, Mendonça AJ, Sousa VRF. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural*. 2010;40(7):1610-15.
- 147.Fernández MS, Salomón OD, Cavia R, Perez AA, Acardi SA, Guccione JD. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Tropica*. 2010;114(2):81-7.
- 148.Bigeli JG, Oliveira JR WP, Teles NMM. Diagnosis of *Leishmania Leishmania*) *chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;4(5):18-23.
149. Oliveira ALL, Paniago AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, Cunha RV, Bóia MN. Foco emergente de Leishmaniose visceral. *Rev Soc. Med. Trop*. 2006;39(5):446-450.
150. Marcondes M, Rossi CN. Leishmaniose visceral no Brasil. *Braz. J. Vet Res Anim Sci*, São Paulo. 2013;50(5):341-352.

Anexos

Anexo 1

Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina/UNESP câmpus de Botucatu.

Três Lagoas 10 de outubro de 2012

Para: Estevão Palma
Secretário do Meio Ambiente de Três Lagoas

De: Maria Angelina da Silva Zuque
Aluna de Doutorado em Doenças Tropicais
Faculdade de Medicina/ UNESP câmpus de Botucatu

Assunto: Solicitação (faz)

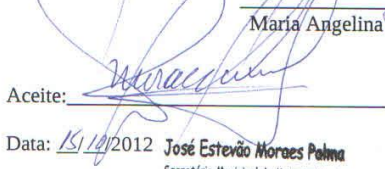
Venho por meio deste, apresentar-me como pesquisadora vinculada ao Curso de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina/UNESP câmpus de Botucatu, em nível de doutorado, com a missão de elaborar uma pesquisa sobre "Participação de gambás e animais domésticos domiciliados como reservatórios de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (syn. *Leishmania* *chagasi*) e *Trypanosoma cruzi* procedentes de municípios da regional de saúde de Três Lagoas", para tanto solicito de V.S.ª autorização para realizar coleta de sangue nos gambás que forem capturados pela Polícia Ambiental, mediante denúncia de moradores, afim de pesquisar a presença de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (syn. *Leishmania* *chagasi*) e *Trypanosoma cruzi* para verificação de prováveis reservatórios na cadeia de transmissão destas doenças.

Informo que será realizada coleta de sangue sob anestesia por veterinário do CCZ e após a observação os mesmos serão devolvidos ao meio ambiente.

O estudo somente terá início após aprovação do comitê de ética, e que informaremos posteriormente a data do início das coletas.

Atenciosamente


Maria Angelina da Silva Zuque

Aceite: 

Data: 15/10/2012 José Estevão Moraes Palma
Secretário Municipal de Meio Ambiente

Anexo 2

Três Lagoas 27 de agosto de 2012

De: Maria Angelina da Silva Zuque
Doutoranda de Doenças Tropicais/UNESP Câmpus Botucatu

Para: Antônio Luiz Teixeira Empke
Coordenador do Centro de Controle de Zoonoses CCZ/Três Lagoas

Prezado senhor

Eu Maria Angelina da Silva Zuque, venho solicitar autorização para utilização dos soros caninos proveniente do inquérito canino, após a realização dos exames para leishmaniose, para pesquisa complementares da tese de doutorado intitulada: "Participação de gambás e animais domésticos domiciliados como reservatórios de Leishmania (Leishmania) infantum (syn. Leishmania chagasi) e Trypanosoma cruzi procedentes de municípios da regional de saúde de Três Lagoas", junto a Faculdade de Medicina/UNESP câmpus de Botucatu.

Atenciosamente

Maria Angelina da Silva Zuque

Deferimento

Antônio Luiz Teixeira Empke
Coordenador do CCZ/TL
Matricula nº : 0009339
Data: 28/08/2012

Dr. Antonio Luiz Teixeira Empke
Médico Veterinário CRPVM - 145.0008
Coordenador do Centro de Controle de Zoonoses
Faculdade de Medicina de Três Lagoas - MS

Anexo 3

Número de casos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH) segundo município de residência, da Regional de Saúde de Três Lagoas (MS). 2000 a 2014.

Municípios	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	TOTAL
Água Clara	-	1	-	1	2	4	1	-	1	4	1	-	2	-	1	18
Bataguassu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Brasilândia	-	-	1	-	-	2	8	9	4	1	1	-	1	-	-	27
Selvéria	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2	1	1	-	-	5
Três Lagoas	1	29	122	28	44	29	30	54	50	21	20	10	7	4	8	457
TOTAL	1	30	123	30	46	35	39	63	55	26	24	11	11	4	9	507

Fonte: NRS/TL

Número de óbitos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH) segundo município de residência, da Regional de Saúde de Três Lagoas (MS). 2000 a 2014.

Municípios	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	TOTAL
Água Clara	-	1	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	1	-	-	5
Bataguassu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Brasilândia	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	3
Selvéria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Três Lagoas	2	4	7	6	7	3	5	-	3	2	2	4	1	2	1	49
TOTAL	2	5	7	6	7	3	8	-	4	3	3	4	3	2	1	58

Fonte: NRS/TL