

Pesquisa de anticorpos para *Leishmania spp* em amostras de sangue de cães da região de Marília/SP, Brasil no período de janeiro de 1999 - junho de 2005

Anti-*Leishmania spp* antibodies survey in blood samples from dogs from region of Marília/SP, Brazil in the period from January 1999 to June 2005

RIALA6/1180

Maria Laura Sales Rodrigues LIMA^{1*}, Saete França PÔRTO¹, Alice Maria dos Santos Ferreira GELSI¹, Argeu Selos MOREIRA¹, Ilda Aparecida Capannaci ALVES¹, Neuza Maria de SOUZA¹, Layde do Vale ESTECI¹, Marina Madalena LICATE¹, Fabrício JACOB¹, Maria Izabel LICATE¹, Edilene Patrícia Dias de MENEZES².

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Marília, Setor de Sorologia/Parasitologia, Rua Lima e Costa nº 1630, Bairro Alto Cafezal, CEP 17506-210, Marília,SP/ Brasil, e-mail: mlsales@ ial.sp.gov.br

²SUCEN – Núcleo de Pesquisa, Laboratório Regional de Marília,SP/Brasil.

Recebido: 22/06/2008 – Aceito para publicação: 08/10/2008

RESUMO

No período de 1999 a 2003, foi realizado o inquérito sorológico pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania spp* em amostras de soro coletadas de cães de 38 municípios da região centro-oeste do estado de São Paulo (Marília). Foram avaliadas as frequências de reatividade para anticorpos anti-*Leishmania spp* detectadas em amostras de soros de cães oriundos de três municípios em dois períodos distintos (1999 – 2003 e 2004 – 2005). No primeiro período, a detecção de anticorpos específicos foi realizada por meio do teste de imunofluorescência indireta (IFI); no segundo período, foi utilizado o ensaio imunoenzimático (EIE) como teste de triagem e a reação de IFI como teste confirmatório. A investigação efetuada no período de 1999-2003 sugere a ausência de circulação da *Leishmania* naquela área. O inquérito realizado na população canina nas cidades de Adamantina, Guarantã e Lucélia no período de 2004 a 2005 indica a introdução deste parasita na região, em função da ocorrência de soropositividade para anticorpos anti-*Leishmania spp*, respectivamente em 14%, 8% e 2,5% das amostras. Até abril de 2008, sete municípios da região de Marília notificaram casos humanos de LVA, dois registraram ocorrência da doença somente em cães; o vetor foi detectado em pelo menos cinco municípios. A expansão da LVA na região centro-oeste do território paulista requer certamente a melhoria das atividades de prevenção e de controle desta doença.

Palavras-chave. *Leishmania*, cão, anticorpos, teste de imunofluorescência indireta, teste imunoenzimático.

ABSTRACT

The data resulted from a survey on anti-*Leishmania spp* antibodies in serum samples from dogs from 38 municipalities located in the mid-west region of São Paulo State (Marília), during the period from 1999 to 2003, were assessed. Also, the rates of these antibodies detection in dogs serum samples from three municipalities at two distinct periods (1999 - 2003 and 2004 - 2005) were analyzed. From 1999 to 2003, the anti- *Leishmania spp* antibodies were determined by indirect immunofluorescence assay (IFA); and in the second period of time, enzyme immunoassay (EIA) was used for screening, and IFA as confirmatory testing. The antibodies survey carried out in the period of 1999-2003 suggests that no circulation of *Leishmania* occurred in that area. Canine surveys conducted in Adamantina, Guarantã and Lucélia municipalities from 2004 to 2005 indicate the occurrence this parasite in the investigated region, as the specific antibodies were detected in 14%, 8%, and 2.5% of dogs serum samples, respectively. Up to April 2008, seven municipalities in Marília region recorded human cases of AVL, and two registered the occurrence of the disease only in dogs; the related vector was detected in at least five municipalities. The increase of AVL cases in the mid-west region of Sao Paulo state certainly requires an improved prevention program and needs to strengthen this disease control activities.

Key words. *Leishmania*, dog, antibody, indirect immunofluorescence assay, immunoenzymatic assay.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por várias espécies de protozoários unicelulares do gênero *Leishmania*, que parasitam o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos¹. Dependendo da espécie de *Leishmania*, pode-se desenvolver a leishmaniose tegumentar americana (LTA) ou a leishmaniose visceral americana (LVA), sendo que esta última pode levar o paciente a óbito se o mesmo não for submetido ao tratamento específico^{1,2,3}. O protozoário é transmitido através da picada da fêmea de insetos da subfamília *Phlebotominae*. Estes insetos apresentam hábitos noturnos e são facilmente encontrados nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, o flebotomo *Lutzomyia longipalpis* é a espécie mais conhecida como transmissora da *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi também identificado como vetor da LVA no Estado do Mato Grosso do Sul^{4,5}. Na região metropolitana de São Paulo, a ocorrência da enzootia canina⁶ leva a supor que outra espécie de flebotomíneo possa estar envolvida com a transmissão. Entre os flebotomíneos coletados nos municípios dessa região (Cotia, Embu e Itapeverica da Serra), destacam-se *Pintomyia fischeri*, *Migonemyia migonei* e *Evandromyia edwardsi*. Desta última espécie, foram encontradas formas flageladas no intestino de cinco exemplares coletados em Cotia, e que após identificação molecular constatou-se ser de *Leishmania braziliensis*. Até o momento, não foi elucidado o mecanismo de transmissão da leishmaniose nessa região^{7,8}. Os principais reservatórios das espécies causadoras de LVA são o cão na área urbana e a raposa no ambiente silvestre. Além destes animais, a LTA tem ainda como potenciais reservatórios os roedores, eqüídeos, marsupiais, preguiças e tamanduás¹.

No mundo, a LVA ou Calazar neotropical tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas. As medidas de controle preconizadas pela Organização Mundial da Saúde incluem a busca ativa de doentes e encaminhamento para diagnóstico e tratamento; o inquérito sorológico canino; a apreensão e a eliminação sumária dos cães soropositivos; borrifação sistemática de inseticida residual nos domicílios e peridomicílios e programas de educação comunitária⁹.

No Brasil, o primeiro caso humano de LVA data de 1913, em paciente de Boa Esperança, Corumbá - Mato Grosso do Sul^{10,11}. Em 1934, 41 casos positivos para o protozoário foram identificados em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem*, sendo que todos os casos eram oriundos das regiões Norte e Nordeste^{10,11}. Desde então, devido ao processo de expansão geográfica, a leishmaniose vem sendo descrita em vários municípios de todas as regiões do Brasil, exceto na região Sul¹². As principais áreas atingidas, em escala de importância, são as regiões Nordeste, Sudeste, Norte e Centro-Oeste. Até a década de 90, a região Nordeste foi a que apresentou os maiores coeficientes de incidência e contribuiu com 90% dos casos registrados no país. Ao final da década de 90, verificou-se

aumento do número de casos, expansão geográfica e urbanização da doença.

Até 1998, no estado de São Paulo, os casos humanos de LVA eram provenientes de outras regiões endêmicas do país. Nesse ano, registrou-se a epizootia canina no município de Araçatuba, região oeste do Estado, onde foi identificada, por meio de técnicas moleculares, a ocorrência da *Leishmania (Leishmania) chagasi*^{7,8}. A presença da espécie *Lutzomyia longipalpis* já havia sido registrada neste município em 1997^{7,8}. A Secretaria de Estado da Saúde, pelos seus órgãos de vigilância, elaborou um projeto para controle da LVA, com prioridade para os municípios da região oeste, incluindo não só a região administrativa de Araçatuba, mas também as de Bauru, Presidente Prudente, São José do Rio Preto e Marília, por se localizarem num raio de 150 km a partir de Araçatuba e estabelecerem fluxo migratório de pessoas e mercadorias. Muitas foram as ações propostas e desenvolvidas, dentre elas a realização de um inquérito sorológico canino amostral para avaliar a extensão e magnitude da infecção canina nos municípios, como também para subsidiar a adoção de medidas de controle mais adequadas¹¹. Em função deste trabalho, constatou-se que a doença não estava restrita ao município de Araçatuba e não estava acometendo apenas os cães, mas também o ser humano. A partir da confirmação do primeiro caso autóctone humano no município de Araçatuba em março de 1999 (Fonte: Divisão de Zoonoses/CVE/SES – dados até 08/07/99), foi realizada a busca ativa de humanos sintomáticos de todos os residentes na área de 200 metros ao redor do caso, incluindo os moradores do domicílio onde ocorreu o caso.

Medidas de controle vêm sendo implementadas pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, por meio do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), em conjunto com as Secretarias Municipais de Saúde (SMS), com o objetivo de reduzir a morbidade e a letalidade humana¹³ por LVA no Estado. O programa de vigilância e controle da LVA inclui ações relacionadas aos seres humanos, vetores e cães. No que se refere aos seres humanos, a vigilância vem sendo realizada pela notificação de casos suspeitos, confirmação mediante exame parasitológico direto ou por critério clínico epidemiológico, tratamento precoce e investigação epidemiológica. Caso humano suspeito é o indivíduo com febre durante mais de duas semanas acompanhada de esplenomegalia e que seja proveniente de área com transmissão de LVA. Também é suspeito o indivíduo que apresenta este quadro sintomatológico sem ser de área com transmissão, desde que os diagnósticos diferenciais de agravos mais frequentes na região^{7,8} permitam caracterizar o caso como suspeito. A vigilância entomológica visa detectar a presença de *L. longipalpis*, conhecer sua distribuição nos centros urbanos e aglomerados rurais, monitorar a variação sazonal dos níveis de infestação e detectar adaptação do vetor. O controle da população canina consiste, principalmente, na eliminação dos animais errantes e na busca ativa seguida da eliminação de cães infectados,

detectados através de exame parasitológico ou sorológico¹⁴. Cão suspeito é o que apresenta pelo menos um dos três seguintes sintomas: descamação, úlcera de pele ou onicogribose, associado a dois ou mais dos seguintes sintomas: ceratoconjuntivite, coriza, apatia, emagrecimento, diarreia, hemorragia intestinal, vômito e aumento de linfonodo¹¹.

O objetivo do presente estudo é apresentar os resultados obtidos nos inquéritos sorológicos para pesquisa de anticorpos para *Leishmania spp* em cães de 38 municípios da região de Marília/SP, Brasil, no período 1999 – 2003, assim como comparar as frequências de detecção destes anticorpos em amostras de sangue de cães oriundos de três municípios coletadas em dois períodos distintos (1999 – 2003 e 2004 – 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, foi feito um levantamento retrospectivo dos resultados obtidos na pesquisa de anticorpos para *Leishmania spp* em amostras de sangue pelos métodos de imunofluorescência indireta (IFI) e/ou ensaio imunoenzimático (EIE), realizada no Setor de Sorologia do Laboratório Regional de Marília, Instituto Adolfo Lutz, Estado de São Paulo, Brasil, a partir de 1999.

Entre os anos de 1999 a 2003 foram analisadas 8.360 amostras de sangue de cães de 38 municípios da região de Marília. No período de 2004 - 2005, foram examinadas 10.807 amostras de três municípios (Guarantã, Adamantina e Lucélia). Do total de 19.185 amostras coletadas, apenas 18 não foram processadas por estarem em condições inadequadas para a realização do exame.

As amostras de sangue foram obtidas através de punção da veia marginal auricular dos cães utilizando-se microlancetas descartáveis. O sangue coletado por capilaridade foi transferido para papel de filtro marca Watman n°1 ou Klabin n°80, e distribuído de uma forma homogênea nos dois lados do papel em um raio de 3 cm. Após secarem à temperatura ambiente, as amostras foram armazenadas em geladeira e transportadas para o laboratório à temperatura ambiente, acondicionadas em caixa de isopor. O sangue foi eluído a partir de pequenos círculos (0,6 cm de diâmetro) picotados do papel de filtro com um picador, em tampão fosfato pH 7,2 (PBS) para a IFI e em diluente próprio do conjunto de EIE. Quando o papel utilizado era o Watman, dois círculos eram colocados em 160 µl de PBS ou 400 µl do diluente de EIE. Para o papel Klabin, um único círculo de papel foi colocado em 200 µl de PBS ou 500 µl do diluente de EIE.

Para a detecção de anticorpos, foram utilizados os conjuntos diagnósticos de IFI e/ou EIE produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. As reações foram feitas de acordo com as instruções do produtor, após a eluição do sangue impregnado no papel de filtro. Resumidamente, a IFI consiste na incubação de alíquotas do sangue eluído e diluído (1:40 e 1:80) com formas promastigotas de *Leishmania*,

fixadas em lâminas de vidro, seguida de incubação com uma solução de anticorpos para a imunoglobulina da classe IgG de cão marcada com fluoresceína e detecção da reação dos anticorpos em microscópio de fluorescência. No EIE, antígenos purificados de *Leishmania* são adsorvidos em uma fase sólida (orifícios de microplacas de polipropileno) e incubados com o sangue dos cães, sendo que a presença de anticorpos nestas amostras é detectada pela adição de uma solução de Anti-IgG de cão marcada com a enzima peroxidase, seguida da adição do substrato específico desta enzima e leitura em espectrofotômetro. Amostras de soro controle (positivo e negativo) foram incluídas em cada teste realizado.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados dos exames sorológicos para a detecção de anticorpos para *Leishmania spp* realizados com amostras de sangue de cães dos municípios da região de Marília. No primeiro período (1999 – 2003), foram examinadas por IFI 8.360 amostras provenientes de 38 municípios. Um total de 8.358 amostras apresentou-se não-reagentes e 2 amostras reagentes no teste de IFI, sendo que as amostras reagentes eram de cães não-nativos do local de coleta (municípios de Gália e Echaporã), ou seja, eram de cães importados¹¹.

No segundo período (2004 – 2005), todas as amostras dos 3 municípios (Guarantã, Adamantina e Lucélia) foram analisadas pelo EIE, e as amostras reagentes e com resultado inconclusivo (zona cinza) foram submetidas a IFI para confirmação da presença de anticorpos. Das 10.807 amostras analisadas, 778 (7%) apresentaram-se reagentes. Do total de amostras reagentes, 127 foram do município de Guarantã, 603 de Adamantina e 48 de Lucélia, com uma porcentagem de positividade de 14%, 8% e 2,5% respectivamente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O papel do cão como reservatório da *Leishmania* foi aventado pela primeira vez na Tunísia em 1908¹⁰, quando experimentalmente foi comprovada a infecção deste animal. Posteriormente, em inquérito realizado naquele país, foi comprovada a transmissão natural em cães e assim registrado o primeiro foco de leishmaniose canina no mundo, fato este consolidado em outras regiões. No Brasil, o papel do cão como reservatório da *Leishmania* foi estabelecido no ano de 1955¹⁰, quando foi constatada a transmissão autóctone (caso canino confirmado, cujo local provável de infecção é o mesmo da residência) da LVA em cães em zona urbana do município de Sobral (CE), verificando-se frequência muitas vezes intensa do parasitismo cutâneo. Em 1957¹⁰, concluiu-se que o cão tinha papel fundamental na epidemiologia da LVA no Brasil.

Tabela 1. Quantidade de amostras processadas e de amostras reagentes nos exames sorológicos para *Leishmania spp* nos municípios da região de Marília.

MUNICÍPIOS	1999 A 2003		2004 A 2005	
	TOTAL	REAGENTE*	TOTAL	REAGENTE
Adamantina	469	-	7.938	603 (8%)
Álvaro de Carvalho	103	-	0	-
Alvinlândia	101	-	0	-
Arco Íris	103	-	0	-
Bastos	214	-	0	-
Campos Novos Paulista	1	-	0	-
Echaporã	205	1	0	-
Fernão	102	-	0	-
Flórida Paulista	205	-	0	-
Gália	109	1	0	-
Garça	408	-	0	-
Guaimbê	100	-	0	-
Guarantã	100	-	925	127 (14%)
Herculândia	103	-	0	-
Iacri	204	-	0	-
Inúbia Paulista	103	-	0	-
Irapuru**	218	-	0	-
Julio Mesquita	103	-	0	-
Lucélia	332	-	1.944	48 (2,5%)
Lupércio	103	-	0	-
Mariápolis	103	-	0	-
Marília	1.905	-	0	-
Ocaçu	103	-	0	-
Oriente	101	-	0	-
Oscar Bressane	101	-	0	-
Oswaldo Cruz	440	-	0	-
Pacaembu	202	-	0	-
Parapuã	206	-	0	-
Pompéia	206	-	0	-
Pracinha	102	-	0	-
Queiroz	100	-	0	-
Quintana	102	-	0	-
Rinópolis	203	-	0	-
Sagres	102	-	0	-
Salmorão	100	-	0	-
Tupã	591	-	0	-
Ubirajara	100	-	0	-
Vera Cruz	207	-	0	-
TOTAL	8.360	2	10.807	778 (7%)

* Cães não-nativos da região de coleta

**Neste período o município pertencia à DIR XIV - Marília

Os resultados das pesquisas de anticorpos para *Leishmania spp* em amostras de sangue canino coletadas em municípios localizados na região centro-oeste (Marília) do interior do Estado de São Paulo no período 1999-2003 (Tabela 1) indicam que não havia a circulação deste protozoário na referida área geográfica, uma vez que os únicos animais com anticorpos detectados não eram autóctones aos municípios que encaminharam as amostras para exame. Entretanto, casos humanos e caninos de LVA¹⁵ foram detectados nos municípios de Promissão e Bauru no período 2002 - 2003 (Fonte: CVE/SES - 1999 a 20/02/2008). Estes dois municípios estão localizados na região central do Estado, pertencem à região administrativa de Bauru e distam cerca de 200 km do município de Araçatuba. O município de Marília está situado a 106km e 163km, respectivamente, de Bauru e Araçatuba¹⁶.

A partir de 2003, casos humanos (Fonte: CVE/SES - 1999 a 20/02/2008) e/ou caninos autóctones de LVA foram identificados em 3 municípios (Adamantina, Guarantã e Lucélia) dos 38 incluídos na pesquisa realizada no período 1999-2003. A realização de inquéritos caninos sorológicos nestes municípios, cujos resultados estão aqui apresentados (Tabela 1), confirmou a circulação de *Leishmania* na região de Marília no período 2004-2005. Para a realização destes inquéritos foi utilizado o teste de EIE (Bio-Manguinhos) na triagem das amostras, e o teste IFI como confirmatório, uma vez que o primeiro permite a análise rápida de grande quantidade de amostras. Conforme informações do fabricante, estudos preliminares de padronização do teste foram realizados por Bio-Manguinhos em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (SP). As amostras de 130 cães com suspeita clínica de LVA foram coletadas em soro e papel de filtro e testadas tanto na IFI quanto no ELISA. Para os cálculos de sensibilidade e especificidade a IFI foi considerado o teste padrão ("Gold Standard") e os índices de sensibilidade e especificidade para as amostras coletadas em papel de filtro foram de 79,45% e 90,24% respectivamente. A IFI demonstrou alta especificidade detectando 8.358 (100%) cães negativos para LV no primeiro período estudado e 10.029 (93%) no segundo, como também 778 (7%) cães positivos neste último.

As freqüências de detecção de anticorpos para *Leishmania spp* em cães nos municípios de Adamantina (8%) e Guarantã (14%) foram mais altas que a encontrada no município de Lucélia (2,5%). Casos humanos de LVA haviam sido identificados nos dois primeiros municípios, mas em Lucélia apenas a infecção canina havia sido detectada quando se deu início ao inquérito. Assim sendo, as diferenças encontradas nas freqüências de detecção de anticorpos podem representar diferentes momentos do ciclo de transmissão do parasita em cada município. Ao analisar os casos humanos de LVA registrados entre 1999 e 2002 no Estado de São Paulo, Camargo-Neves et al⁷ verificaram que o maior número de casos ocorreu nos municípios com as maiores prevalências de infecção canina e que existe uma relação espaço-temporal na qual a doença canina, na grande maioria das vezes, precedeu a detecção de casos humanos^{17,18,19,20,21}, principalmente em municípios onde o vetor já havia sido registrado anteriormente.

Em 2006, a prevalência de infecção canina média obtida no Estado de São Paulo em inquéritos censitários realizados em 30 dos 43 municípios com transmissão canina foi de 7,3%, variando de 0 a 20%⁸. Segundo Camargo-Neves et al.⁷, a expansão e a adaptação do vetor vêm ocorrendo lentamente, tendo sido registradas, inicialmente, em municípios contíguos a Araçatuba e, depois, naqueles que estabeleceram fluxo migratório de pessoas e mercadorias com município da região de Araçatuba. Posteriormente, ocorreu a expansão e adaptação do vetor em outras regiões administrativas, como Bauru, Marília e Presidente Prudente, seguindo pelos grandes eixos rodoviários e ferroviários. Em seus estudos, Camargo-Neves et al.¹⁴ chamam a atenção para o fato de que, entre as condições que indicam maiores riscos de manutenção do ciclo de transmissão da doença, estão a alta densidade populacional de cães, a prevalência de infecção canina superior a 2%, a ocorrência de casos humanos há mais de dois anos e a população com baixo nível socioeconômico. A descontinuidade das ações de controle, tanto aquelas relacionadas ao reservatório doméstico como as relacionadas ao vetor, é um fator que favorece a manutenção da transmissão.

A identificação da espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* a partir de material biológico de cão ou ser humano é o critério laboratorial de referência para a confirmação de casos suspeitos de LVA, sendo a mesma realizada por meio de técnicas fenotípicas e/ou moleculares^{7,8,10,11}. A detecção de anticorpos para *Leishmania spp* em material biológico canino é um critério laboratorial de confirmação de caso apenas em áreas geográficas onde a transmissão de *Leishmania (Leishmania) chagasi* foi comprovada, uma vez que outras espécies podem estar circulando e estimulando a resposta imune humoral nos cães. Esta espécie foi identificada²² pelo Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo (SP) a partir de material biológico de cães residentes nos três municípios da região de Marília estudados no período 2004-2005.

Até abril de 2008, casos humanos de LVA foram registrados em 7 municípios da região de Marília (Guarantã, Adamantina, Lucélia, Osvaldo Cruz, Flórida Paulista, Pacaembu e Parapuã), enquanto dois municípios (Inúbia Paulista e Mariápolis) registraram ocorrência somente em cães¹⁵. Todos os municípios da região estão vulneráveis (próximos a áreas com transmissão) e pelo menos cinco municípios foram classificados como receptivos, ou seja, tiveram o vetor detectado^{11,15}. Estes dados mostram a magnitude e extensão da LVA neste território paulista e a necessidade da intensificação das atividades de vigilância, prevenção e controle, dirigidas à população humana, à população canina e ao vetor.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra. Lílian Regina Macelloni Marques e a Dra Marta Regina Caseto Furian Zorzetto pela revisão do texto, e a Nelson Hakamada pela sua dedicação e colaboração na área de informática.

REFERÊNCIAS

1. Gontijo B, Carvalho MLR de. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*.2003; 36(10):71-80.
2. Gontijo CMF, Mello MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*.2004;7(3): 338-49.
3. Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil-emerging Anthroozoonosis and possibilities form their control. *Cad Saúde Pública*.1994; 10 (Suppl 2): 359-75.
4. Medeiros ACR, Roselino AMF. Leishmaniose Tegumentar Americana: do histórico aos dias de hoje. *An Bras Dermatol*.1999; 74: 329-36.
5. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, De Paiva HM, De Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*.1998; 12: 315-7.
6. Tolezano JE, Rodrigues E, Barbosa JER, Cunha E, Taniguchi HH, Barbosa JAR, et al. Expansão da Leishmaniose visceral por terras paulistas. Focos de transmissão de LV canina em municípios da região metropolitana de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*.2003; 36 (Suppl 1): 360.
7. Camargo-Neves VLF de. Superintendência de Controle de Endemias (Sucen), Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. *Bepa*.2004; 1:6.
8. Camargo-Neves V, Superintendência de Controle de Endemias - Sucen/SES-SP , Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD/SES-SP. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. *Bepa*.2007; 4(48): 12-4.
9. World Health Organization Manual on Visceral Leishmaniasis Control. Division of Control of Tropical Diseases. Geneve: WHO; 1996.
10. Secretaria de Estado da Saúde (SP). Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjack. Superintendência de Controle de Endemias. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria do Programa Estadual de DST/AIDS. Instituto Pasteur. II Informe Técnico. Leishmaniose Visceral Americana. São Paulo: CVE; 2003.
11. Camargo-Neves VLF de, Glasser CM, Cruz LL, Almeida RG. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2006.
12. Brasil. Ministério da Saúde. FUNASA. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.
13. Camargo-Neves VLF de, Katz G. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32 (Suppl.2): 63-4.
14. Camargo-Neves VLF de. Leishmaniose Visceral Americana: doença emergente no estado de São Paulo. *Comciencia*[serial online] 2005 junho[cited 2005 Jun 10]. Disponível em:URL: http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/17_impr.shtml
15. Grupo de Estudos em Leishmanioses. Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD). Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP). Classificação epidemiológica dos municípios para leishmaniose visceral americana. Estado de São Paulo, abril de 2008. *Bepa*.2008; 5(52): 20-5.
16. Brasil. Departamento de Estrada de Rodagem (DER); WebRotas. Disponível em: <http://www.der.sp.gov.br>. Acesso em 14 julh.2008.
17. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saúde Públ*.2004;20(1): 259-65.
18. Galimbertt MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C, Costa AI et al. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*.1999; 32 (Suppl. 1): 217.
19. Gomes AC, Silva AR, Costa CHN, Scherlock I, Costa JML, Shaw J et al. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). Normas Técnicas. Fundação Nacional da Saúde, Brasília; 1996.
20. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Bol Epidemiol*.2002;6: 1-11.
21. Paranhos Silva M, Freitas LAR, Santos WC, Grimaldi Jr-G, Pontes de Carvalho LC, Oliveira dos Santos, AJ. A cross-sectional serodiagnostic suvey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Méd Hyg*.1996; 55:39-44.
22. Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLSR, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL, et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*.2007; 144: 234-41.