



Estudos da fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e infecção natural por *Leishmania infantum* em municípios da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil

Studies on the phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and on the natural infection by *Leishmania infantum* in municipalities of northwest region of the State of São Paulo

RIALA6/1720

Vanessa Gusmon da SILVA¹, Helena Hilomi TANIGUCHI¹, Virgínia Bodelão RICHINI-PEREIRA², Diego Borin NÓBREGA³, Carlos Roberto ELIAS¹, José Eduardo TOLEZANO^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo Parasitoses Sistêmicas, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902. Tel: 11 3068 2891. Email: tolezano@hotmail.com

²Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro do Laboratório Regional de Bauru, Instituto Adolfo Lutz

³Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary

Recebido: 23.09.2016 - Aceito para publicação: 23.03.2017

RESUMO

A expansão geográfica e o crescente aumento dos casos de leishmaniose visceral na região noroeste do estado de São Paulo despertaram o interesse em desenvolver estudo para identificar a fauna flebotomínica e avaliar sua infecção natural por *Leishmania infantum* nos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga. Foram realizados inquéritos entomológicos com a utilização de armadilhas luminosas do tipo CDC, instaladas em diferentes ecótopos peridomiciliares, durante o período de agosto de 2013 a novembro de 2014. A detecção de DNA de *L. infantum* em flebotomíneos foi realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram coletados 507 flebotomíneos, sendo 116 fêmeas (22,9%) e 391 machos (77,1%), representados por sete espécies, com predomínio de *Lutzomyia longipalpis*, com 461 exemplares (90,9%). As análises moleculares revelaram DNA de *L. infantum* em um exemplar de *L. longipalpis* capturado em Fernandópolis. Estes resultados confirmam a presença desta espécie nos municípios pesquisados. E o encontro de pelo menos um exemplar, naturalmente infectado, em Fernandópolis evidencia a necessidade de realizar ações de controle direcionadas aos vetores neste município, com o intuito de conter sua dispersão e prevenir a ocorrência de casos humanos de leishmaniose visceral.

Palavras-chave. leishmaniose visceral, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania*.

ABSTRACT

The geographical expansion and the increase of visceral leishmaniasis cases in northwest region of the São Paulo state aroused the interest of conducting a study to identify the phlebotomine sandflies fauna, and to evaluate the rate of natural infection by *Leishmania infantum* in Fernandópolis, Santa Fé do Sul and Votuporanga. Entomological surveys were conducted using the CDC miniature light traps, installed in different types of peridomestic ecotopes, during the period from August 2013 to November 2014. The *L. infantum* DNA detection in phlebotomine sandflies was performed by means of conventional Polymerase Chain Reaction (PCR). Five hundred seven phlebotomine sandflies specimens were collected, being 116 females (22.9%) and 391 males (77.1%), which were represented by seven species, prevailing *Lutzomyia longipalpis*, with 461 specimens (90.9%). Molecular analysis revealed DNA of *L. infantum* in one specimen of *L. longipalpis* from Fernandópolis. These findings confirm the occurrence of this species in all of the surveyed municipalities. And the existence of at least one specimen, naturally infected in Fernandópolis, highlights the need for performing the further control measures directed to the vectors in this municipality, for restraining their spread and to prevent the occurrence of human cases of visceral leishmaniasis.

Keywords. visceral leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania*.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave de um complexo de doenças humanas e animais denominadas leishmanioses, sendo endêmica, em 70 países e está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais¹. Seu grande impacto na saúde pública ocorre devido às altas taxas de letalidade e morbidade, bem como a sua endemicidade em populações de baixa renda de diversos países, tornando-a, assim uma das doenças mais negligenciadas em todo o mundo².

No estado de São Paulo, a doença foi notificada, pela primeira vez, em 1999, no município de Araçatuba e, desde então, expandiu-se pelo estado, primeiramente nos municípios adjacentes à Araçatuba e, subsequentemente naqueles que estabeleceram um fluxo migratório com os municípios endêmicos da região do extremo oeste paulista³⁻⁵.

Com a identificação de foco de leishmaniose visceral na mesorregião de São José do Rio Preto, confirmada em 2009, primeiramente, no município de Jales e, posteriormente, expandindo-se aos municípios de Urânia, Santa Fé do Sul e Votuporanga, estudos vêm sendo desenvolvidos na região com o intuito de explicar o quadro epidemiológico da doença^{6,7}. Assim, este estudo tem como objetivo realizar um levantamento da fauna flebotômica e avaliar a taxa de infecção natural dos mesmos por *Leishmania infantum* nos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

As coletas entomológicas foram realizadas nos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga, todos da mesorregião de São José do Rio Preto (**Figura**). Esta mesorregião tem como linhas demarcatórias os rios Paraná

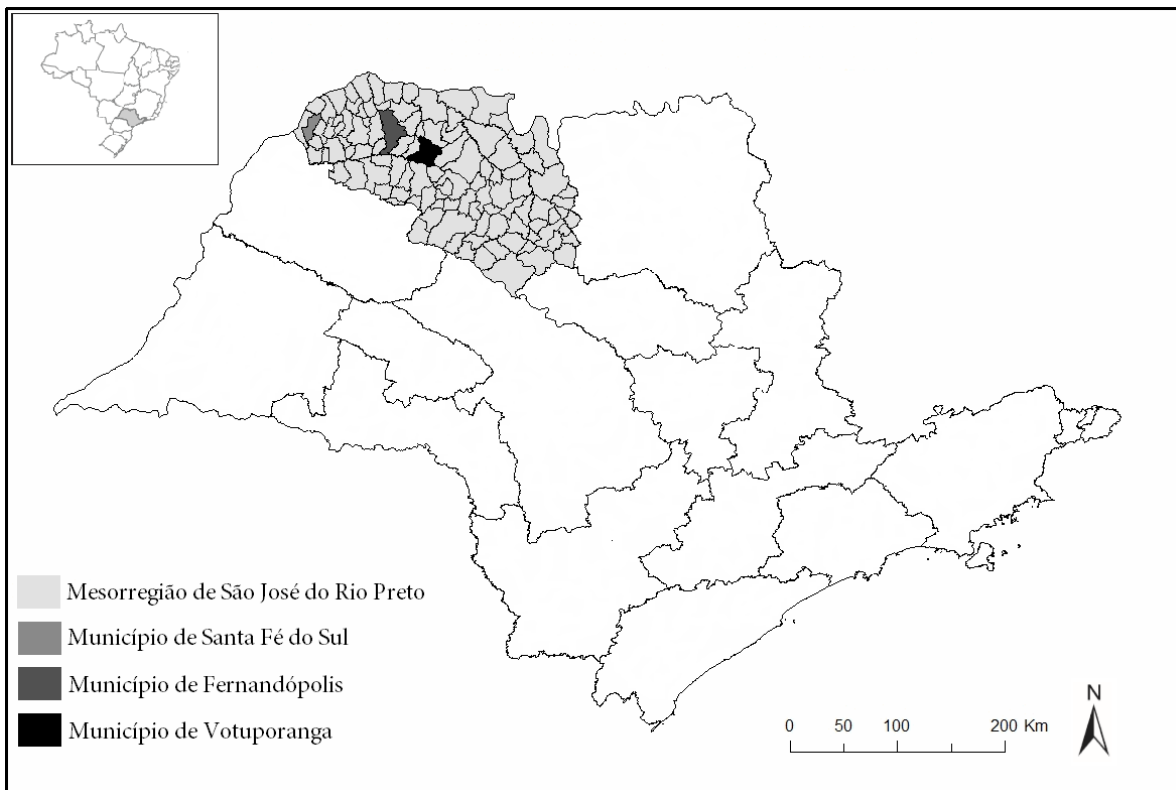


Figura. Mapa do estado de São Paulo, destacando a mesorregião de São José do Rio Preto e os municípios de Santa Fé do Sul, Fernandópolis e Votuporanga

e Grande, e, em sua composição física, apresenta um relevo pouco acidentado, localizada no Planalto Ocidental da Bacia Sedimentar do rio Paraná, sobre as formações Adamantina e Santo Anastácio, ambas as unidades do Grupo Bauru⁸. De acordo com o Sistema de Informação Ambiental do Programa Biota/Fapesp – SinBiota⁹, a vegetação da região é constituída por fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual (Mata Atlântica) em contato com agrupamentos de Savana (Cerrado). Segundo a classificação de Köppen, a região é caracterizada, predominantemente, pelo clima tropical chuvoso com inverno seco (Aw), cuja temperatura média no mês mais frio é superior a 18 °C. Apresenta também precipitações superiores a 750 mm anuais, podendo chegar a 1800 mm¹⁰.

Coleta e identificação dos flebotomíneos

As coletas foram realizadas de forma não sistematizada, durante o período de agosto de 2013 a novembro de 2014 (Tabela 1), utilizando armadilhas de isca luminosa do tipo CDC instaladas em distintos ecótopos peridomiciliares (galinheiros, pocilgas, currais, canis e áreas de mata) em 49 pontos de coleta: sendo 4 em Fernandópolis, 6 em Santa Fé do Sul e 39 em Votuporanga. As armadilhas foram posicionadas a uma altura de, aproximadamente, um metro do solo, sendo estas ligadas pouco tempo antes do crepúsculo vespertino e desligadas e/ou retiradas após o crepúsculo matutino, permanecendo, assim, funcionando durante todo o período noturno ininterruptamente.

Os flebotomíneos machos foram examinados conforme descrito por Forattini¹¹, em relação

às fêmeas, somente a cabeça e os três últimos segmentos foram montados em lâmina e lamínula, e o restante do corpo foi encaminhado para análise molecular. A identificação e a nomenclatura taxonômica foram realizadas de acordo com Galati¹².

Diagnóstico molecular da infecção dos flebotomíneos

As fêmeas foram agrupadas em *pools* (1-6 espécimes) de acordo com a espécie, data e local da coleta. O DNA foi extraído por meio do kit DNeasy[®] Blood & Tissue (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante com algumas modificações. Estas incluíram, inicialmente, duas incubações com proteinase K e Buffer ATL, sendo a primeira com duração de uma hora a 56 °C, seguida por outra a 70 °C por 10 minutos. Outra incubação por 10 minutos a 56 °C também foi realizada, quando se adicionou o Buffer AL.

O DNA extraído foi amplificado, primeiramente, usando os seguintes iniciadores para amplificação do gene ITS1 de *Leishmania*¹³: LITSR (5' CTGGATCATTTTCCGATG 3') e L5.8S (5' TGATACCACTTATCGCACTT 3'), que amplificam um fragmento de 300-350 pares de base¹⁴. A mistura de reação (12 µL) foi preparada contendo a concentração final de 0,2 µM de cada iniciador; 1,6 mM de MgCl₂; 0,2 mM dNTP (Invitrogen[®]); 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen[®]), tampão da enzima e 1 µL de DNA da amostra. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador automático Veriti[®] Thermal Cycler (Applied Biosystems[®]), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial

Tabela 1. Frequência mensal das coletas de flebotomíneos realizadas nos municípios pesquisados, entre o período de agosto de 2013 a novembro de 2014

Ano	Número de coletas entomológicas																Total	
	2013					2014												
	Mês	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out		Nov
Município																		
Fernandópolis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	-	-	-	4
Santa Fé do Sul	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
Votuporanga	4	2	-	2	6	5	4	3	-	-	-	1	2	7	-	2	38	

a 95 °C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 20 segundos (desnaturação), 53 °C durante 30 segundos (anelamento) e 72 °C durante 60 segundos (extensão), e com uma extensão final de 72 °C por 6 minutos. Para cada bateria de amostra submetida à amplificação, foi utilizado um controle negativo (água livre de nucleasse) e um controle positivo (DNA extraído de cultura de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903).

Em sequência, as amostras positivas na primeira reação foram submetidas a PCR espécie-específica, dirigida a um fragmento de minicírculo de kDNA de *L. infantum*. Os iniciadores usados foram Lch14 (5' CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG 3') e Lch15 (5' TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA 3') que amplificam um fragmento de 167 pares de base¹⁵. A mistura de reação (12 µL) foi preparada contendo a concentração final de 0,2 µM de cada iniciador; 1,6 mM de MgCl₂; 0,2 mM dNTP (Invitrogen®); 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da enzima e 1 µL de DNA da amostra. As condições térmicas foram aplicadas como descrito por Lachaud et al¹⁶. A cada conjunto de reações foi utilizado um controle negativo (água livre de nucleasse) e dois controles positivos (DNAs extraídos de culturas de *L. infantum* MHOM/BR/2002/LPC-RPV e *L. infantum*).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 % corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®), e visualizados pelo Software GeneTools (Syngene) usando o transluminador DigiGenius (Syngene).

Análises estatísticas

Os dados foram organizados em planilhas e as análises descritivas foram registradas no programa Microsoft Excel® (Office 2010). A taxa mínima de infecção foi estimada como descrito por Paiva et al¹⁷. Também foi calculado o risco relativo de um flebotômico fêmea infectar um ser humano com *L. infantum*, através do Índice Estimado do Risco de Exposição (IERE), de forma simplificada, conforme descrito por Orshan et al¹⁸, que consiste na multiplicação do percentual de fêmeas infectadas (número de *pools* positivos dividido pelo número total de fêmeas analisadas) pelo número de espécimes

do sexo feminino coletados nas capturas relevantes.

Intervalos de confiança para as proporções estimadas foram calculados seguindo-se a distribuição binomial. Análises foram conduzidas no software R.

RESULTADOS

No total foram coletados 507 flebotômicos, representados por 391 (77,1 %; IC95 %: 73,2 - 80,7) machos e 116 (22,9 %; IC95 %: 19,3 - 26,8) fêmeas. No município de Fernandópolis foram coletados 55 flebotômicos, dos quais 7 (12,7 %; IC95 %: 5,3 - 24,5) eram fêmeas; em Santa Fé do Sul foram coletados 70 flebotômicos, sendo 7 (10 %; IC95 %: 4,1 - 19,5) fêmeas em apenas dois dos seis pontos de coleta instalados; e, em Votuporanga foram coletados 382 flebotômicos, sendo 102 (26,7 %; IC95 %: 22,3 - 31,4) fêmeas em 38 dos 39 pontos de coleta onde foram colocadas armadilhas luminosas.

Na **Tabela 2**, verifica-se que foram coletadas 7 espécies de flebotômicos, representadas por *Brumptomyia avellari*, *Brumptomyia cunhai*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia sallesi*, *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia whitmani*. Nos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga, a espécie predominante foi *L. longipalpis* com 92,8 %; 95,8 % e 89,9 %, respectivamente.

A PCR foi realizada em 116 fêmeas de flebotômicos agrupadas em 53 *pools*, sendo 1 *pool* de *E. lenti* e 4 de *L. longipalpis* oriundos de Fernandópolis; 4 *pools* de *L. longipalpis* de Santa Fé do Sul; e, 3 *pools* de *B. avellari*, 5 de *E. lenti* e 37 de *L. longipalpis* provenientes de Votuporanga. Destes, somente um exemplar de *L. longipalpis*, proveniente de Fernandópolis, coletado em galinheiro, amplificou tanto na PCR gênero-específico para *Leishmania* quanto na PCR espécie-específico para *L. infantum*.

De modo geral, considerando que um *pool* de flebotômico apresentou positividade da PCR, foi possível deduzir uma taxa de infecção de 0,86% (1/116 fêmeas; IC95 % 0,0 - 4,7 %). No entanto, ao avaliarmos esta taxa por município pesquisado, o município de Fernandópolis apresentou uma taxa mínima de infecção de 16,5 % (1/6 fêmeas;

Tabela 2. Total de flebotomíneos coletados nos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga

Espécie	Fernandópolis					Santa Fé do Sul					Votuporanga				
	M	F	T	%	IC95%	M	F	T	%	IC95%	M	F	T	%	IC95%
<i>B. avellari</i>	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	12	6	18	4,7	3,3 - 6,5
<i>B. cunhai</i>	0	0	0	0	-	1	0	1	1,4	0,2 - 5,1	0	0	0	0	-
<i>E. lenti</i>	1	1	2	3,6	1,0 - 9,0	2	0	2	2,8	0,8 - 7,2	11	6	17	4,4	3,1 - 6,2
<i>E. sallesi</i>	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	3	0	3	0,8	0,3 - 1,7
<i>L. longipalpis</i>	45	6	51	92,8	86,2 - 96,8	60	7	67	95,8	91,0 - 98,4	253	90	343	89,8	87,4 - 91,8
<i>M. migonei</i>	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	1	0	1	0,3	0,0 - 0,9
<i>N. whitmani</i>	2	0	2	3,6	1,0 - 9,0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-
Total	48	7	55	100	-	63	7	70	100	-	280	102	382	100	-

M: macho, F: fêmea, T: total

IC95 % 0,4 – 64,1 %). A probabilidade ou risco de uma espécie de flebotomíneo infectar um ser humano com *L. infantum* foi estimada em 14,3 % no município de Fernandópolis.

DISCUSSÃO

Todas as espécies coletadas nas áreas de estudo já haviam sido registradas anteriormente no estado de São Paulo^{12,19}.

Das 7 espécies coletadas, *L. longipalpis*, a principal vetora de *L. infantum*, foi a espécie predominante, representando 90,9 % dos exemplares coletados. Esta espécie é altamente antropofílica e de grande adaptabilidade aos ambientes antrópicos. Além disso, o comportamento eclético apresentado por *L. longipalpis* concomitantemente com a presença de animais domésticos e sinantrópicos favorecem a aproximação e a manutenção destes insetos no ambiente peridomiciliar²⁰. Esta característica comportamental foi evidenciada nos três municípios pesquisados, uma vez que todos os exemplares foram coletados em abrigos de animais domésticos circundados ou não por árvores frutíferas próximas às habitações humanas.

Apesar de terem sido coletadas em pequeno número, duas outras espécies de importância epidemiológica, por serem incriminadas na transmissão de *L. braziliensis*, principal agente

etiológico da leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo²¹, foram coletadas em Fernandópolis e Votuporanga, são elas: *M. migonei* e *N. whitmani*, respectivamente.

E. lenti foi a segunda espécie predominante, representando 4 % das espécies coletadas, e presente nos três municípios estudados. Apesar da baixa proporção, esta espécie merece destaque, pois já foi encontrada naturalmente infectada por *L. braziliensis*, em Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, e *L. infantum*, em Minas Gerais²²⁻²⁵. Esta espécie é comumente encontrada em tocas de animais silvestres, anexos domésticos e, até mesmo, em paredes externas e internas de domicílios^{26,27}. Neste estudo, *E. lenti* foi coletada associada aos anexos de animais domésticos nos municípios de Fernandópolis (galinheiro) e Santa Fé do Sul (pocilga); já em Votuporanga, foi capturada somente em um ponto de coleta caracterizado por apresentar uma residência muito próximo à área de mata.

Embora pouco expressiva, também merece destaque a espécie *E. sallesi*, que já foi encontrada naturalmente infectada por *L. infantum* em Lassance, MG, podendo estar envolvida em ciclos silvestres e/ou rurais de transmissão de LV nesta região²⁸. Os espécimes desta espécie foram coletados nas proximidades de uma residência inserida em uma trilha ecológica, constituída de vegetação primária, localizada em área urbana do município de Votuporanga.

O gênero *Brumptomyia*, que apresenta preferência alimentar por dasipodídeos (tatus), e, desta forma, encontra-se comumente associada a eles²⁶, foi representada por duas espécies: *B. avellari* e *B. cunhai* nos municípios de Votuporanga e Santa Fé do Sul, respectivamente. Estas espécies foram coletadas em armadilhas instaladas em abrigos de animais domésticos (pocilgas) adjacentes às áreas de mata, os quais, possivelmente, apresentam tocas de dasipodídeos em suas proximidades.

Com relação ao sexo, verificou-se predominância de machos em todos os municípios pesquisados, foram coletados 391 (77,1 %) exemplares machos e 116 (22,9 %) fêmeas. Estes dados corroboram aos encontrados por outros estudos, nos quais, na maioria das coletas, observa-se um número maior de machos que fêmeas^{25,29}. Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicar este padrão. Uma delas leva em consideração a emergência tardia das fêmeas em relação aos machos^{30,31}. A outra leva em consideração a liberação de mediadores químicos, tais como cairomônios e feromônios, pelos hospedeiros vertebrados e flebotomíneos. Estudos realizados por Kelly e Dye³² sobre a dinâmica de agregação de *L. longipalpis* mostram que os machos, atraídos por cairomônios liberados por galináceos, liberam feromônios e formam aglomerados com o intuito de atrair as fêmeas ao local do repasto sanguíneo, garantindo, assim, a cópula.

Neste estudo foi possível detectar a infecção de uma fêmea de *L. longipalpis* por *L. infantum* pela primeira vez no município de Fernandópolis, apresentando uma taxa de infecção natural do município em 16,5 %. Dados similares foram relatados por Saraiva³³, em Belo Horizonte, MG, onde uma taxa de infecção de 19 % foi observada em *L. longipalpis* por *L. infantum*. Entretanto, este achado deve ser analisado com cautela, pois, em ambos os estudos, foram avaliados um número reduzido de insetos coletados nas localidades pesquisadas.

Dentre as variáveis utilizadas para a avaliação dos fatores de risco para leishmaniose visceral, considerando os dados entomológicos, um dos parâmetros valorizados é o da exposição

humana à picada dos flebotomíneos infectados^{18,34}. Nesse estudo, foi estimado um IERE de 14,3 % no município de Fernandópolis, considerado superestimado em razão da alta taxa de infecção obtida no município, decorrente do reduzido número de coletas entomológicas realizadas.

CONCLUSÃO

Em resumo, este estudo contribuiu para o conhecimento da fauna flebotomínica na região noroeste do estado de São Paulo, no entanto, estudos mais sistematizados são necessários para uma melhor caracterização da fauna de flebotomíneos nas regiões pesquisadas. Além disso, foi adicionalmente demonstrada a detecção de DNA de *L. infantum* em *L. longipalpis*, confirmando a sua capacidade e competência vetorial, e, demonstrando que a infecção circula em flebotomíneos encontrados no ambiente peridomiciliar. Por fim, esses achados evidenciam que as medidas de vigilância e controle precisam ser urgentemente estabelecidas nos municípios com o intuito de evitar a dispersão dos casos de leishmaniose visceral.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo 134438/2013/2). Aos médicos veterinários Mileno Castro Tonissi, Fabiana Sisto Sandrin Giacometi e Élcio Sanchez Esteves Júnior, das Prefeituras de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga, respectivamente, bem como de toda a equipe dos CCZs pela colaboração nas coletas de flebotomíneos. E a equipe de campo do IAL, José Eduardo R. Barbosa, Roberto M. Hiramoto, Edson B. dos Anjos, Juliana M. Guerra e Natália C. C. A. Fernandes no auxílio das coletas entomológicas.

Financiamento: PPSUS-FAPESP 12/51267-4 e SVS-MS Chamamento de Pesquisa 20/2013.

REFERÊNCIAS

1. Organização Mundial da Saúde – OMS. Regional Office for South-East Asia. FAQs: Frequently asked questions on visceral leishmaniasis (kala-azar). New Delhi. Índia: OMS; 2014. p. 20.
2. Organização Mundial da Saúde – OMS. Control of leishmaniasis. In: WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis. Genebra. Suíça: OMS; 2010. p.186.
3. Camargo-Neves VLF, Katz G. Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 1999;32(Supl.2):63-4.
4. Tolezano JE, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araújo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR, et al. Leishmaniose Visceral Americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico de uma doença emergente em terras paulistas. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 1999;32(Supl.2):218.
5. 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*. 2013;47(4):1-9. [DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047004454>].
6. Scandar SAS, Silva RA, Cardoso Júnior RP, Oliveira FH. Ocorrência de leishmaniose visceral americana na região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil. *Bepa*. 2011;8(88):13-22.
7. Oliveira AM, Guirado MM, Dibo MR, Rodas LAC, Bocchi MR, Chiaravalloti Neto F. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* and human and canine cases of visceral leishmaniasis and evaluation of their expansion in the northwest region of the state of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(1):41-50. [DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0353-2015>].
8. Silva FP, Kiang CH, Caetano-Chang MR. Hidroestratigrafia do Grupo Bauru (K) no estado de São Paulo. *Águas Subterrâneas*. 2005; 19(2): 19-36. [DOI:<http://dx.doi.org/10.14295/ras.v19i2.8225>].
9. Sistema de Informação Ambiental do Programa Biota/Fapesp – SinBiota. Atlas Biota 2.1. [acesso em 2016 Ago 23]. Disponível em: [<http://sinbiota.biota.org.br/>].
10. Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura – Cepagri. Clima dos municípios paulistas: a classificação climática de Köppen para o estado de São Paulo. [acesso em 2016 Ago 23]. Disponível em: [<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>].
11. Forattini OP. Entomologia médica. 4ª ed. São Paulo: Ed. Edgard Blucher; 1973.
12. Galati EAB. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos. Apostila da disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. São Paulo: Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. 126p.
13. El Tai NO, Osman OF, EL Fari M, Presber W, Schönián G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(5):575-9.
14. Schönián G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47(1): 349-58. [DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2)].
15. Silva RC, Richini-Pereira VB, Kikuti M, Marson PM, Langoni H. Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. *Vet Q*. 2007;37(1):23-30. [DOI:<http://dx.doi.org/10.1080/1652176.2016.1252073>].
16. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2002;40(1):210-5. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.1.201-215.2002>].
17. Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Júnior HF, Malafronte RS. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia polimerase. *Cad Saúde Pública*. 2007;23(1):87-94.

18. Orshan L, Elbaz S, Bem-Ari Y, Akad F, Afik O, Ben-Avi I, et al. Distribution and Dispersal of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in a Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis Focus, the Northern Negev, Israel. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(7):1-21. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004819>].
19. Shimabukuro PHF, Galati EAB. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop*. 2011;11(Supl.1):685-704.
20. Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad Saúde Pública*. 2003;19(5):1373-80.
21. Miranda JC, Dias ES. Vetores das leishmanioses nas Américas. *In*: Barral A, Costa J. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*. 2011. v.1, p. 55-64.
22. Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol*. 2010;47(6):1212-9.
23. Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sandflies captured in Mato Grosso do Sul, State, Brazil. *Acta Trop*. 2010;115(1-2):126-30. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.013>].
24. Sanguinette CC. *Leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, Brasil: estudos dos flebotomíneos e da leishmaniose canina*. [dissertação]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz; 2011.
25. Lana RS, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Lara-Silva FO, Lima ACVMR, et al. Phlebotomine sandfly fauna and *Leishmania* infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a natural brazilian heritage site. *BioMed Research International*. 2015: 9p.
26. Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição e Hábitats. *In*: Rangel EF, Lainson R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 207-55.
27. Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91(6):671-84.
28. Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcão AL, et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol*. 2009;46(5):1159-63.
29. Sanguinette CC, Silva DF, Stumpp RGV, Rego FD, Tonelli GB, Tanure A, et al. Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil. *Parasit Vectors*. 2015;8:428. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1003-2>].
30. Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peri-domiciliares, no estado de São Paulo. *Arq Fac Hig Saúde Pública*. 1953;7:157-65.
31. Galati EAB, Nunes VLB, Rêgo Júnior FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1997;31(4) 378-90.
32. Kelly DW, Dye C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Animal Behavior*. 1997;53(4):721-31.
33. Saraiva L. *Estudos da fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), sua infecção natural por Leishmania spp. e aspectos biogeográficos da leishmaniose visceral, na região nordeste do município de Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil*. [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
34. Kolaczinski JH, Reithinger R, Worku DT, Ocheng A, Kasimiro J, Kabatereine N, et al. Risk factors of visceral leishmaniasis in East Africa: a case-control study in Pokot territory of Kenya and Uganda. *Int J Epidemiol Advance*. 2008; 32(2)-34452. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dym275>].