

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MUNICÍPIO DE  
CARATINGA, MINAS GERAIS, 2007 - 2021.**

por

Rafael Luiz da Silva Neves

Belo Horizonte  
2023

**RAFAEL LUIZ DA SILVA NEVES**

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MUNICÍPIO DE  
CARATINGA, MINAS GERAIS, 2007 - 2021.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis.

Orientação: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares.

Co-orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo.

Belo Horizonte  
2023

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

N518d 2023 Neves, Rafael Luiz da Silva.

Distribuição espacial e aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga, Minas Gerais, 2007 - 2021 / Rafael Luiz da Silva Neves. - Belo Horizonte, 2023.

167 f. : il. color.

Orientador: Rodrigo Pedro Pinto Soares.

Coorientadora: Célia Maria Ferreira Gontijo.

Tese (Doutorado Acadêmico em Ciências da Saúde), Belo Horizonte, 2023.

Bibliografia: f. 78 - 90.

1. Leishmaniose Cutânea/transmissão. 2. *Leishmania braziliensis*/patogenicidade. 3. Psychodidae/parasitologia 4. Epidemiologia/estatística & dados numéricos. 5. Urbanização/tendências I. Título.

CDD 616.936

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica:  
Segemar Oliveira Magalhães – CRB/6 1975 FIOCRUZ. Instituto René Rachou.  
Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener

**RAFAEL LUIZ DA SILVA NEVES**

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MUNICÍPIO DE  
CARATINGA, MINAS GERAIS, 2007 - 2021.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis. Orientador: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (Instituto René Rachou/FIOCRUZ) Presidente

Profa. Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (Instituto René Rachou/FIOCRUZ) Titular

Profa. Dra. Mariângela Carneiro (Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG) Titular

Profa. Dra. Camila Indiani de Oliveira (Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis (Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP) Titular

Prof. Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo (Instituto René Rachou/FIOCRUZ) Suplente

**Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 27/02/2023**

*A todas as pessoas presentes na minha vida  
às quais chamo de família.*

## AGRADECIMENTOS

Elaborar, experimentar e dar sentido a uma tese de Doutorado não é uma tarefa simples. No entanto, agradecer e reconhecer o papel das pessoas em nossas vidas requer a percepção e uma postura de vida mais ampla e profunda, e que em tudo se manifesta.

Nossa mente nos prega peças constantemente e diante deste fato admito que aqui neste tópico eu possa ser falho e talvez esquecer nomes, fatos ou situações.

Agradecer está bem além de dizer um “muito obrigado”. Agradecer tem a ver com o respeito e a humildade com que caminhamos na vida. Aqui iriei ser um pouco mais democrático e contar um pouco da minha história. Todos os nomes aqui citados acrescentaram de “n” formas minha caminhada. O resultado final foi a conclusão deste estudo e a realização deste sonho. Este trabalho não é só meu, mas sim de todas as pessoas que se fazem presentes na minha vida.

Todas estas pessoas estão presentes na minha vida, e todas elas foram aqui colocadas, cada uma em seu lugar graças a presença de Deus. Agradeço a Ele, por me permitir realizar este objetivo, por ter me dado discernimento, força e coragem.

À minha família, mãe e irmão Zenilda e Adalberto, pelo amor, ajuda e apoio durante estes quatro anos. Obrigado pelo carinho e conforto.

Aos amigos que a vida colocou ao meu lado, Ana Laura, Cristiano Massara, Jacinto Rodrigues, Maria da Consolação Bragança e Rosália Maria. Acreditem que este sonho só foi realizado graças à presença destes anjos na minha vida.

Aos meus orientadores Dra. Célia Gontijo e Dr. Rodrigo Soares que poucos meses antes da minha entrada no Instituto me aceitaram, me acolheram e me deram todo o ensinamento que foi essencial nesta jornada.

Às amizades que foram criadas na Fiocruz, deixo meus sinceros agradecimentos aos hoje amigos para toda a vida Alessandra Mara, Felipe Dutra, Jerônimo Rugani, Jucelia Amorim e Silvana Faria.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, com palavras de apoio ou críticas, contribuíram para o meu crescimento e para a realização deste trabalho.

Agradeço à Agência Financiadora, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) que tornou este trabalho possível.

À Biblioteca do IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrando o rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

## RESUMO

Historicamente, o município de Caratinga foi uma importante área endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Desde a década de 1960, essa área foi monitorada por diversos pesquisadores que estabeleceram um centro de referência em saúde para o manejo da LTA. Este local foi importante para diagnóstico, tratamento, ensaios de imunoterapia e vigilância ecoepidemiológica. Esse serviço de referência foi descontinuado no início dos anos 2000 e apenas alguns serviços de saúde locais conseguiram suprir essa lacuna. Embora os casos de LTA tenham continuado ao longo dos anos, nenhum estudo epidemiológico foi realizado nesta área nas últimas duas décadas. A maioria dos estudos epidemiológicos em Caratinga foi bastante descritiva. Aqui, utilizamos ferramentas de análise espacial para examinar a situação epidemiológica e a distribuição espacial da leishmaniose tegumentar americana no município de Caratinga entre 2007-2021. Além disso, potenciais vetores de flebotômíneos foram capturados. Todas as informações utilizadas neste estudo foram retiradas dos arquivos de saúde pública e confirmadas nos bancos de dados dos Serviços Estaduais de Saúde. Todos os casos foram analisados por meio do software de Sistemas de Informação Geográfica. Além disso, coletas de flebotômíneos e detecção molecular de *Leishmania* foram realizadas nas áreas com maior número de casos. Durante o período analisado, os casos de LTA aumentaram e permaneceram elevados nos últimos anos. Os *hotspots* incluíram as áreas urbanas da cidade de Caratinga e os bairros de Patrocínio de Caratinga e Sapucaia. As espécies *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia intermedia* e *Migonemyia migonei* foram as espécies mais abundantes e a técnica ITS1-PCR detectou DNA de *Leishmania* nessas espécies. Com base em nossas análises, a urbanização do ATL em Caratinga ocorreu nos últimos anos. Devido ao aumento do número de casos humanos e da presença de vetores, recomenda-se que as autoridades de saúde foquem nas medidas de controle nos focos de calor.

**Palavras-chave:** Leishmaniose cutânea, análises espaciais, urbanização, *Leishmania braziliensis*, Psychodidae.

## ABSTRACT

Historically, the municipality of Caratinga was an important endemic area for American Tegumentary Leishmaniasis (ATL). Since the 1960s, this area was monitored by several researchers that established a health reference center for ATL management. This place was important for diagnosis, treatment, immunotherapy trials and eco-epidemiological surveillance. This reference service was discontinued in the early 2000s and only a few local health services managed to fill this gap. Although ATL cases continued along the years, no epidemiological studies were performed during the past two decades in this area. Most epidemiological studies in Caratinga were very descriptive. Here, we used spatial analysis tools to examine the epidemiological situation and spatial distribution of American Tegumentary Leishmaniasis in the municipality of Caratinga between 2007-2021. In addition, potential sand fly vectors were captured. All information used in this study was retrieved from public health archives and confirmed in the State Health Services databases. All cases were analyzed using Geographic Information Systems software. In addition, sand fly collections and molecular detection of *Leishmania* were carried out in areas with the highest number of cases. During the analyzed period, ATL cases increased and remained high in the last years. The hotspots included urban areas of Caratinga city and the districts of Patrocínio of Caratinga and Sapucaia. The species *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia intermedia* and *Migonemyia migonei* were the most abundant species and the ITS1-PCR technique detected *Leishmania* DNA in these species. Based on our analyses, the urbanization of ATL in Caratinga has taken place in recent years. Due to the increase in the number of human cases and the presence of vectors, it is recommended that health authorities focus on control measures in hotspots.

**Keywords:** Cutaneous Leishmaniasis; Spatial Analyses; urbanization, *Leishmania braziliensis*; Psychodidae.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Localização do município de Caratinga no Estado de Minas Gerais, região do Vale do Rio Doce (A) e localização dos dez distritos que compõem o município de Caratinga (B).  
.....31
- Figura 2:** Áreas de coleta entomológica no município de Caratinga durante os anos de 2020 e 2021 (A); pontos de coleta no Córrego Volta Grande, Patrocínio de Caratinga (zona rural, R1 – R20) (B); pontos de coleta na área urbana de Caratinga (zona urbana, U1 – U6) (C) e pontos de coleta na área de transição do distrito de Sapucaia (zona de transição, T7 – T10) (D).....35
- Figura 3:** Número de triênios com casos de LTA no município de Caratinga (A) e na cidade de Caratinga (B).....48
- Figura 4A:** Incidência acumulada dos casos LTA registrados no município de Caratinga por triênio, entre os anos de 2007 a 2021. ....49
- Figura 4B:** Incidência acumulada dos casos de LTA registrados na área urbana de Caratinga por triênio, entre os anos de 2007 a 2021 .....50
- Figura 5:** Elipses de distribuição dos casos de LTA no município de Caratinga (A) e na área urbana de Caratinga (B), por triênio, durante o período de 2007 a 2021 .....52
- Figura 6A:** Densidade de Kernel dos casos de LTA no município de Caratinga por triênio, entre os anos de 2007 a 2021.....54
- Figura 6B:** Densidade de Kernel dos casos de LTA na área urbana de Caratinga por triênio, entre os anos de 2007 a 2021.....56
- Figura 7:** Risco Relativo dos casos de LTA registrados no distrito de Patrocínio de Caratinga (A) e na área urbana de Caratinga (B).....57

<b>Figura 8:</b> Armadilhas luminosas instaladas no Córrego Volta Grande, região de Patrocínio de Caratinga em 2020 .....	<b>61</b>
<b>Figura 9:</b> Armadilhas luminosas instaladas no Córrego Volta Grande, região de Patrocínio de Caratinga em 2020 .....	<b>61</b>
<b>Figura 10:</b> Centro da cidade de Caratinga visto do bairro Anápolis, Caratinga, 2021.....	<b>62</b>
<b>Figuras 11:</b> Armadilha luminosa instalada no bairro Limoeiro, cidade de Caratinga. ....	<b>62</b>
<b>Figura 12:</b> Vista geral da praça central do distrito de Sapucaia, 2021 .....	<b>63</b>
<b>Figura 13:</b> Vista geral da área residencial do distrito de Sapucaia, 2021.....	<b>64</b>
<b>Figura 14:</b> Densidade de flebotomíneos coletados na área urbana de Caratinga (zona urbana, U1 – U6) e nos distritos de Sapucaia (zona de transição, T7 – T10) e Patrocínio de Caratinga (zona rural, R1 – R20) no período de 2020 a 2021. Em <b>(A)</b> o total de flebotomíneos coletados, <b>(B)</b> o total da espécie <i>Ny. whitmani</i> , <b>(C)</b> o total da espécie <i>Ny. intermedia</i> , <b>(D)</b> o total da espécie <i>Mg. migonei</i> , <b>(E)</b> o total das outras espécies de flebotomíneos coletadas e <b>(F)</b> o total de pools contendo flebotomíneos infectados.....	<b>65</b>
<b>Figura 15:</b> Agrupamento hierárquico apresentando a similaridade entre as áreas de coleta entomológica. Em vermelho os locais de coleta na zona urbana (U1 – U6), cidade de Caratinga; em preto, a zona rural (R1 – R20), Córrego Volta Grande, distrito de Patrocínio de Caratinga; e em azul, zona de transição (T7 – T10), distrito de Sapucaia.....	<b>67</b>
<b>Figura 16:</b> Gel de agarose apresentando a detecção de DNA de <i>Leishmania</i> em fêmeas de flebotomíneos utilizando a região intergênica <i>ITS 1</i> . Legenda: PM: peso molecular (100 pb); CP: controle positivo ( <i>Leishmania braziliensis</i> ); 19 a 35: pools da coleta entomológica realizada em janeiro de 2020 no Córrego Volta Grande, região do distrito de Patrocínio de Caratinga e CN: controle negativo (machos da espécie <i>Nyssomyia whitmani</i> ).....	<b>68</b>
<b>Figura 17:</b> Gel de agarose apresentando a detecção de DNA de <i>Leishmania</i> em fêmeas de flebotomíneos utilizando a região intergênica <i>ITS 1</i> . Legenda: PM: peso molecular (100 pb);	

CP: controle positivo (*Leishmania braziliensis*); 202 a 211: pools da coleta entomológica, realizada em janeiro de 2020 no Córrego Volta Grande, região do distrito de Patrocínio de Caratinga e CN: controle negativo (machos da espécie *Nyssomyia whitmani*).....**68**

**Figura 18:** Gel de agarose apresentando a detecção de DNA de *Leishmania* em amostras humanas, obtidas no Serviço de Saúde de Caratinga. Legenda: PM: peso molecular (100 pb); CP: controle positivo (*Leishmania braziliensis*); 1 a 14: amostras provenientes de biópsias humanas.....**69**

## LISTA DE GRÁFICO

<b>Gráfico 1:</b> Média móvel dos casos de LTA no período de 2007 a 2021 .....	<b>46</b>
--	-----------

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados sociodemográficos dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga, Minas Gerais, notificados no período de 2007 a 2021.....	<b>41</b>
<b>Tabela 2:</b> Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga por local de residência, zona, ano e mês do diagnóstico, no período de 2007 a 2021 .....	<b>43</b>
<b>Tabela 3:</b> Dados relacionados aos aspectos clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga, no período de 2007 a 2021 .....	<b>44</b>
<b>Tabela 4:</b> Incidência dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por 10.000 habitantes no município de Caratinga no período de 2007 a 2021.....	<b>45</b>
<b>Tabela 5:</b> Número de casos de LTA por cidade/distrito durante o período de 2007 a 2021 .....	<b>47</b>
<b>Tabela 6:</b> Área afetada, por triênio, no município de Caratinga .....	<b>52</b>
<b>Tabela 7:</b> Número de flebotomíneos coletados por ano e local de coleta no município de Caratinga entre 2020 e 2021 .....	<b>58</b>
<b>Tabela 8:</b> Flebotomíneos capturados e separados por sexo e pontos de coleta na localidade do Córrego Volta Grande, região de Patrocínio de Caratinga em 2020 .....	<b>59</b>
<b>Tabela 9:</b> Flebotomíneos capturados e separados por sexo e local de coleta na área urbana de Caratinga em 2021 .....	<b>61</b>
<b>Tabela 10:</b> Flebotomíneos capturados e separados por sexo e local de coleta no distrito de Sapucaia em 2021 .....	<b>63</b>
<b>Tabela 11:</b> Análise da diversidade e similaridade da fauna flebotomínica nas áreas de coleta no município de Caratinga.....	<b>66</b>

<b>Tabela 12:</b> Fontes de repasto sanguíneo identificadas em fêmeas de flebotomíneos coletadas no município de Caratinga no período de 2020 e 2021 .....	<b>70</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	grau Celsius
1-D	Índice de Simpson
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CytB	Citocromo B
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GIS	Sistema de Informação Geográfica
GPS	Global Positioning System
H	Shannon-Weiner
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IGBE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>ITS – I</i>	Internal Transcribed Spacer I
J	Equitabilidade de Pielou
Km <sup>2</sup>	Quilômetro quadrado
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LRV1	Vírus de RNA de <i>Leishmania</i>
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
mM	Micromolar
N	Abundância individual
ng	nanograma
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso Molecular
pmol	picomol
R	zona rural
RNA	Ácido ribonucleico
RR	Risco Relativo
S	Riqueza dos táxons
SIG	Sistema de Informação Geográfica
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
T	zona de transição

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U	zona urbana
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
$\mu\text{L}$	Microlitro



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	
	2.1 O gênero <i>Leishmania</i> : Taxonomia, ciclo biológico e formas clínicas	22
	2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana	24
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
	4.1 Geral	29
	4.2 Específicos	29
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b>	
	5.1. Aspectos éticos	30
	5.2 Área de estudo	30
	5.3 Delineamento do estudo	31
	5.4 Análise dos dados	32
	5.5 Análise espacial	32
	5.5.1 Elipse	33
	5.5.2 Densidade de Kernel	33
	5.5.3 Análise de varredura de aglomerados espaço-temporal – Satscan	33
	5.6 Estudo dos flebotomíneos	34
	5.6.1 Avaliação da diversidade e similaridade da fauna flebotomínica	36
	5.7 Estudos moleculares	37
	5.7.1 Extração do DNA das fêmeas de flebotomíneos para detecção da infecção por <i>Leishmania</i> spp.	37
	5.7.2 Extração do DNA das amostras obtidas de casos humanos para detecção da infecção por <i>Leishmania</i> spp.	38
	5.7.3 PCR dirigida ao <i>Internal Transcribed Spacer I (ITS I)</i> do rDNA	39
	5.7.4 Identificação das fontes de repasto sanguíneo em fêmeas de flebotomíneos	40
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	
	6.1 Análise de dados	41
	6.2 Análise espacial	51
	6.3 Estudo dos flebotomíneos	57
	6.4 Estudos moleculares	67

<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>
	<b>ANEXOS</b>	
	<b>Anexo 1 - Artigo 1 – Neves <i>et al.</i>, 2021. A follow-up study (2007 – 2018) on American Tegumentary Leishmaniasis in the municipality of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil: Spatial analyses and sand fly collection .....</b>	<b>91</b>
	<b>Anexo 2 - Artigo 2 – Neves <i>et al.</i>, <i>submetido</i>. Increased risk of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) in an urban and rural of Caratinga, Brazil between 2007 – 2021.....</b>	<b>112</b>
	<b>Anexo 3 - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa .....</b>	<b>156</b>
	<b>Anexo 4 - Licença permanente para coleta de material zoológico .....</b>	<b>162</b>
	<b>Anexo 5A - Autorização da Secretaria de Saúde de Caratinga 2020.....</b>	<b>164</b>
	<b>Anexo 5B - Autorização da Secretaria de Saúde de Caratinga 2021 .....</b>	<b>165</b>
	<b>Anexo 6 - Termo de sigilo .....</b>	<b>166</b>
	<b>Anexo 7 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>167</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária que acomete o homem e animais e é causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903). Os fatores climáticos, econômicos e sócio-ambientais influenciam o ciclo de transmissão e determinam os padrões epidemiológicos da doença (Reithinger *et al.*, 2007; Cárdenas *et al.*, 2008).

Surtos da LTA ocorrem no município de Caratinga, leste do estado de Minas Gerais, desde a década de 1960, sendo relatados principalmente em trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos. Esse fenômeno atraiu pesquisadores pioneiros para essa área endêmica liderados pelo Dr. Wilson Mayrink gerando conhecimentos importantes sobre a LTA no Brasil (Mayrink *et al.*, 1979a). Historicamente, a presença de seu grupo junto às autoridades locais foi responsável pela criação de um Centro de Referência em Leishmaniose na cidade, onde foi possível diagnosticar, tratar e acompanhar pacientes com LTA por várias décadas (Mayrink *et al.*, 2013). Além disso, vários estudos ecoepidemiológicos sobre vetores, reservatórios e ensaios de imunoterapia foram desenvolvidos na área, ajudando a controlar a doença (Dias *et al.*, 1977; Mayrink *et al.*, 1979b). Essas medidas foram baseadas principalmente no diagnóstico precoce, tratamento de pacientes e pulverização de inseticidas (Magalhães *et al.*, 1980).

Em relação ao manejo dos pacientes, o Centro de Referência de Caratinga foi muito importante para a padronização do Teste de Montenegro, atualmente em desuso (Mayrink *et al.*, 1976; Melo *et al.*, 1977; Mayrink *et al.*, 1979b). Este teste foi empregado com sucesso em ensaios de campo para testar uma vacina contra a doença. De fato, esta vacina consistia em uma mistura de parasitos mortos de cepas/espécies do gênero *Leishmania* (Mayrink *et al.*, 1979b). Após três anos uma proporção das pessoas vacinadas permanecia positiva ao teste de Montenegro sugerindo uma resposta imune duradoura. Nesses indivíduos, nenhum episódio de LTA foi relatado nos três anos seguintes de acompanhamento (Mayrink *et al.*, 1978). Mais tarde, ensaios vacinais também foram realizados e avaliados em outras áreas endêmicas, incluindo o estado do Espírito Santo e Amazonas, com resultados bem-sucedidos (Mayrink *et al.*, 1985; Antunes *et al.*, 1986).

Além dos relatos clínicos em humanos, diversos estudos ecoepidemiológicos foram realizados em Caratinga. Na década de 70, a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* foi apontada como o principal agente etiológico da LTA na região de Caratinga. Curiosamente, em algumas dessas cepas foi detectada a presença do vírus LRV1 (Ogg *et al.*, 2003), conhecido por

umentar a gravidade da doença (Ives *et al.*, 2011). Mais tarde, duas cepas de *Leishmania major* foram identificadas entre os parasitos isolados dos pacientes. Essa descoberta foi muito surpreendente, uma vez que essa espécie é comumente encontrada no Velho Mundo e foi isolada de trabalhadores rurais que nunca haviam deixado a região (Silva *et al.*, 2009). Ainda não se sabe como a espécie *L. major* foi introduzida na área e qual o vetor e o reservatório incriminados em sua transmissão. Uma pesquisa entomológica realizada nas áreas rurais detectou a presença de *Nyssomyia whitmani* e *Migonemyia migonei* (Mayrink *et al.*, 1979a). Embora este último seja um vetor permissivo, seu papel na transmissão de *L. major* ainda está por ser determinado (Nogueira *et al.*, 2017; Guimarães *et al.*, 2018). Em relação aos reservatórios, a presença de parasitos do gênero *Leishmania* foi encontrada em cães, mas não em roedores selvagens (Dias *et al.*, 1977). Isso é esperado, já que em reservatórios selvagens a carga parasitária é muito baixa e, naquele momento, técnicas moleculares sensíveis não estavam disponíveis (Schalling *et al.*, 2007; Marcelino *et al.*, 2011).

Desde os anos 90, Sistemas de Informação Geográfica (SIG) e métodos espaciais de análise tornaram-se ferramentas valiosas para estudos epidemiológicos no campo da saúde em doenças infecciosas ou não (Yeshiwondim, Gopal, 2009; Banerjee, 2016; Duncan *et al.*, 2017; Nuñez-González, Gault, Simancas-Racines, 2019). Essas análises podem ajudar os gestores locais a formular políticas de saúde e monitorar as áreas afetadas por uma determinada doença (Nasser, Donalísio, Vasconcelos, 2009; Souza *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2014; Melo, Rossoni, Teodoro, 2017; Gonçalves *et al.*, 2019; Marchi *et al.*, 2019). No caso das leishmanioses, essas ferramentas foram utilizadas na última década para as formas tegumentar e visceral (Barbosa *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2014).

Em 1999, Machado-Coelho *et al.* realizaram em Caratinga um estudo apresentando a distribuição espacial dos casos de LTA no período de 1966 a 1996. Foi sugerido que as taxas da doença variaram no espaço e no tempo devido a fatores ambientais e ligados aos pacientes (Machado-Coelho *et al.*, 1999). Nas duas últimas décadas, estudos espaciais não foram realizados no município de Caratinga.

Minas Gerais é um dos estados brasileiros com maiores taxas de transmissão no país. Em 2015, um acidente ecológico em uma área de mineração resultou em grande contaminação do Rio Doce, o principal curso de água que cruza a área. Este evento resultou em sérios danos ambientais e econômicos à população local (Queiroz *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2020). No entanto, seu impacto nas doenças vetoriais como a Leishmaniose ainda é incerto. Recentemente, dois estudos demonstraram que cinco mesorregiões, incluindo o norte do estado e o Vale do Rio Doce, onde o município de Caratinga está localizado, são as mais afetadas pela LTA

(Cardoso *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2020). Esses estudos mostraram que diversas áreas do estado de Minas Gerais apresentam um risco de transmissão de moderado a alto em áreas periurbanas, como resultado de características ecológicas e diversidade de vetores. Nesta região, as populações mais vulneráveis incluíam crianças, gestantes e indígenas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O gênero *Leishmania*: Taxonomia, ciclo biológico e formas clínicas

O gênero *Leishmania* é notável pelo grande número de espécies descritas envolvendo inicialmente dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Lainson, Shaw, 1987). Recentemente, um terceiro subgênero, o *Mundinia*, englobando espécies inicialmente classificadas no complexo *Leishmania enriettii* foi criado (Espinosa *et al.*, 2016). Análises filogenéticas recentes sugerem não só uma diversidade elevada de espécies, mas também uma separação clara entre estes grupos (Akhoudi *et al.*, 2016; Butenko *et al.*, 2019). Inicialmente, uma classificação para o gênero *Leishmania* foi proposta com base em dados moleculares, dividindo o gênero *Leishmania* em duas linhagens filogenéticas: *Euleishmania* e *Paraleishmania* (Cupolillo *et al.*, 2000). A linhagem *Euleishmania* compreenderia quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e o complexo *Leishmania enriettii*, hoje considerado *Mundinia*. A linhagem *Paraleishmania* inclui as espécies *Leishmania hertigi*, *Leishmania deanei*, *Leishmania herreri*, *Leishmania equatorensis* e *Leishmania colombiensis*, esta última patogênica para humanos, e o gênero *Endotrypanum* (Espinosa *et al.*, 2016; Paranaíba *et al.*, 2017; Paranaíba *et al.*, 2018; Butenko *et al.*, 2019). O subgênero *Viannia* é restrito a regiões neotropicais, enquanto o subgênero *Leishmania* ocorre no Novo e no Velho Mundo. Cinquenta e três espécies são conhecidas, destas, 29 estão presentes no Velho Mundo, 20 no Novo Mundo, três (*Leishmania orientalis*, *Leishmania martiniquensis* e *Leishmania infantum*) são encontradas tanto no Velho quanto no Novo Mundo, e uma espécie na Austrália (*Leishmania macropodum*). Das espécies conhecidas, 21 são descritas por infectar seres humanos (Maroli *et al.*, 2012).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos aos mamíferos pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas, que ao exercer hematofagismo, necessário a continuidade do seu ciclo de vida, transmitem a forma infectante do parasito para estes animais. São descritas 98 espécies, distribuídas entre os gêneros *Phlebotomus*, *Migonemyia*, *Pintomyia*, *Evandromyia*, *Nyssomyia* e *Lutzomyia* como vetores comprovados ou suspeitos de transmitir alguma das espécies de *Leishmania* que causam as diferentes formas das leishmanioses (Galati, 2003; Maroli *et al.*, 2012). As espécies pertencentes a este gênero possuem um ciclo de vida digenético, envolvendo diferentes formas de desenvolvimento. Estas formas apresentam adaptações às condições encontradas nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (Sacks, Kamhawi, 2001, Kamhawi, 2006; Volf, Myskova, 2007; Dostálová, Volf, 2012).

A infecção do hospedeiro vertebrado se inicia quando uma fêmea infectada realiza o repasto sanguíneo. Durante o processo, conhecido por telmatofagia, o vetor inocula as formas promastigotas metacíclicas no local da picada e estas, escapam dos mecanismos de defesa do hospedeiro vertebrado (Kaye, Scott, 2011; De Assis *et al.*, 2012) podendo ser fagocitadas por macrófagos ou neutrófilos recrutados no local da picada (Peters *et al.*, 2008). Dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos as promastigotas diferenciam-se em amastigotas e se multiplicam por divisão binária. Após a multiplicação, os macrófagos se rompem e liberam os parasitos que em seguida serão fagocitados por outras células ou ingeridos pelo flebótomo durante o repasto sanguíneo. As formas ingeridas pelo vetor são confinadas na matriz peritrófica, secretada por células que revestem o epitélio intestinal dos insetos hematófagos, composta por proteínas, glicoproteínas e quitina (Pimenta *et al.*, 1992; Pruzinova *et al.*, 2015).

No bolo alimentar envolvido pela matriz peritrófica, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas que se multiplicam e sofrem várias mudanças morfológicas (nectomonas, haptomonadas e metacíclicas). Após a ruptura da matriz, devido a quitinases liberadas pelo parasito e pelo vetor, as formas promastigotas que resistiram às enzimas digestivas aderem-se ao epitélio do trato digestivo do flebotomíneo. Essa adesão é proporcionada por lipofosfoglicano (Kamhawi *et al.*, 2004). O não escape da matriz e a ausência de adesão à parede do epitélio faz com que os parasitos sejam eliminados ao fim da digestão pelo inseto (Sacks, Perkins, 1984; Pimenta *et al.*, 1994). Posteriormente passam pelo processo de diferenciação, denominado metaciclogênese e se desprendem do epitélio intestinal. Além das modificações bioquímicas, as formas metacíclicas apresentam redução no tamanho do corpo celular e aumento do flagelo que passa a ocupar cerca de 2/3 do tamanho do parasito. As formas metacíclicas infectantes juntamente com vários componentes, incluindo o gel secretado por promastigotas, saliva, exossomos e microbiota, serão novamente inoculadas no hospedeiro vertebrado pelo vetor (Sacks, Kamhawi, 2001; Bates, Rogers, 2004; Kamhawi, 2006; Bates, 2007; Dey *et al.*, 2018).

Nos mamíferos, tais como, cães, marsupiais, roedores e humanos, os parasitos do gênero *Leishmania* vivem e se multiplicam intracelularmente em células fagocíticas. Embora tais espécies sejam morfológicamente muito semelhantes, elas causam diferentes formas clínicas como a cutânea, mucosa, disseminada, difusa e visceral (Herwaldt, 1999). A Leishmaniose Visceral (LV), causada pela *Leishmania infantum* possui como sintomas febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia e sem tratamento, é fatal em mais de 95% dos casos. O curso da infecção é definido por uma série de fatores associados ao parasito, como carga parasitária, espécie, cepa e forma evolutiva, e ao hospedeiro, como imunidade inata, sistema

complemento e quimiocinas (Conceição-Silva, Alves, 2014; Shaw *et al.*, 2015; Akhoundi *et al.*, 2016; Espinosa *et al.*, 2016). A LTA, objeto do presente estudo, se caracteriza por lesões na pele e úlceras nas partes expostas do corpo, deixando após a cura, cicatrizes permanentes. No Brasil, as espécies comumente descritas como causadoras da LTA são *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergui*. Nos últimos anos a LTA tem apresentado alta incidência no Brasil (Brasil, 2017).

## 2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar é endêmica em 98 países, com estimativas de cerca de 1 a 1,5 milhão de novas infecções por ano (WHO, 2010). Aproximadamente 75% dos casos notificados no mundo são originários do Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Nicarágua, Peru, Síria e Sudão (WHO, 2010; Alvar *et al.*, 2012). A LTA é, portanto, um problema de saúde pública mundial, pois, além da elevada incidência, é considerada uma doença negligenciada pelos programas de controle de doenças infecciosas tropicais (Alvar *et al.*, 2012; Von Stebut, 2015).

No Novo Mundo e em nossa área de estudo, município de Caratinga, a LTA é causada principalmente por *L. braziliensis* (Dias *et al.*, 1977; Mayrink *et al.*, 1979a). Porém, cabe ressaltar que a espécie *Leishmania major* também já foi isolada nesta região o que representa um achado único (Silva *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2021).

A LTA apresenta uma ampla variação de sintomas e manifestações clínicas. Em muitos casos, surge uma lesão com bordas elevadas caracterizada como leishmaniose cutânea. Dependendo da espécie e do tropismo do parasito, outras formas clínicas podem ocorrer, incluindo: cutâneo-mucosa, cutânea difusa e disseminada. Em pacientes da terra indígena Xakriabá, em São João das Missões, Minas Gerais, algumas manifestações cutâneas diferiram das lesões típicas de leishmaniose cutânea, sendo descritas como lupóide, verrucosa ou vegetativa, sendo classificadas como formas cutâneas “atípicas” (Quaresma *et al.*, 2011).

Nas Américas, a LTA está presente em 18 países e no ano de 2012 foram registrados 52.919 casos, dos quais 44,9% estavam concentrados no Brasil que concentra a maioria dos casos relatados no Novo Mundo (Maia-Elkhoury *et al.*, 2016). Do total de casos notificados, 89,5% correspondem à forma cutânea e 4,2% à forma mucosa. Em relação ao perfil social,



71,4% pertencem ao sexo masculino e 72,1% ocorrem na faixa etária de 10 a 50 anos. O critério utilizado para o diagnóstico da maioria dos casos de LTA foi o laboratorial (72,7%).

No Brasil, estudos realizados nos estados do Paraná (Melo, Rossoni, Teodoro, 2017), São Paulo (Fonseca *et al.*, 2014), Amazonas (Oliart-Guzmán *et al.*, 2013) e Minas Gerais (Temponi *et al.*, 2018) mostraram que a LTA é demograficamente uma doença rural. Indivíduos do sexo masculino em idade laboral e com baixo nível educacional são geralmente os mais afetados. Melo *et al.* (2017), mostraram que a forma cutânea da leishmaniose é a forma mais prevalente (98,0%) e a quimioterapia o principal método de controle. É interessante notar que, apesar da maioria dos casos ser de origem rural, um número considerável de casos foi notificado como urbano. O município de Caratinga está incluído em uma das mesorregiões mais afetadas pela LTA no estado de Minas Gerais (Cardoso *et al.*, 2019). O município é uma área fortemente afetada por ações ambientais, incluindo atividades antrópicas, como plantações de café, mineração e criação de pastagens.

No Brasil, os vetores comprovados da LTA são: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia intermedia*, *Psychodopygus wellcomei* e *Mi. migonei*. Em um estudo realizado na Barra do Gravatá, município de Araçuaí, Minas Gerais foi encontrado *Ny. intermedia* (99,2%) como a espécie mais abundante (Gontijo *et al.* 2002). No Distrito Sanitário de Venda Nova, Saraiva *et al.*, (2017), foi encontrado 95,3% da espécie *Lu. longipalpis*, com um nível de infecção de 1,01% para *L. infantum* e 1,77% para *L. braziliensis*. Recentemente foi realizado por Tanure *et al.*, (2020) um estudo da diversidade de flebotomíneos em Brumadinho, Minas Gerais, apresentando taxas de 9,1% para *Mi. migonei* (9,1%), 15,2% para *Lu. longipalpis* e 70,9% para *Ny. whitmani*. Cabe ressaltar que em inúmeras cidades brasileiras, não há sequer o conhecimento das espécies de flebotomíneos associadas à transmissão das espécies de *Leishmania*. Em Caratinga, estudos sobre a fauna flebotomínica são escassos, sendo os dados oriundos dos inquéritos realizados pelo grupo do Dr. Mayrink nos períodos de: 1973/1974 e 1976/1977 na localidade do Barracão e em 1978 em São João do Jacutinga (Mayrink *et al.*, 1979a). A escassez de dados sobre as espécies de flebotomíneos nos motivou a realizar um estudo para comparar e atualizar a diversidade de espécies na região uma vez que em quase 50 anos muitas características ambientais na região de Caratinga foram permanentemente modificadas. Uma de nossas áreas de estudo neste trabalho, Patrocínio de Caratinga, é limítrofe com São João do Jacutinga. Deste modo, investigamos a fauna flebotomínica após anos do estudo de Mayrink *et al.* (1979a).

Estudos epidemiológicos feitos no Brasil mostram dados da infecção natural por espécies do gênero *Leishmania* em animais silvestres e sinantrópicos. No país, a infecção

natural por *L. braziliensis*, já foi evidenciada nos gêneros: *Proechimys* (Lainson, Shaw, 1973), *Oryzomys* (Lainson, Shaw, 1989), *Akodon* (Brandão-Filho *et al.*, 2003), *Holochilus* (Marinho-Júnior, 2010), *Trichomys* (Quaresma *et al.*, 2011), *Gracilinamus* (Quaresma *et al.*, 2011), *Nectomys* (Lima *et al.*, 2013), *Rattus* (Ferreira *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017) *Cerradomys* (Pereira *et al.*, 2017) e *Didelphis* (Schallig *et al.*, 2007; Freitas, 2010; Quaresma *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2017). Em 1977, Dias *et al.*, realizando um estudo sobre reservatórios da LTA em Caratinga obteve resultados inconclusivos. O mesmo ocorreu no estudo de, Mayrink *et al.*, em 1979. Tal fato se justifica pela falta, naquele período de testes moleculares mais sensíveis. Por este motivo se faz necessário a investigação deste cenário em Caratinga nos dias atuais.

Na Região Norte do país, a ocorrência e manutenção da LTA estão associadas à expansão para áreas anteriormente indenes, mantendo altos coeficientes nos últimos anos. A abertura de estradas, a implantação de áreas agrícolas, o treinamento militar e a instalação de núcleos habitacionais em áreas florestais são fatores importantes relacionados ao perfil epidemiológico da LTA na Amazônia brasileira, uma vez que a manutenção dos ciclos biológicos dos parasitos ocorre entre vetores e animais silvestres. Nesse contexto, na maioria das vezes, as pessoas se infectam quando alteram o ambiente natural, interpõem o ciclo da vida selvagem e/ou entram nesse outro ecossistema (Guerra *et al.*, 2003).

Nos estados do Acre, Amazonas e Rondônia a infecção e manutenção do ciclo de transmissão por espécies de *Leishmania* se deve a dois elementos distintos e bem conhecidos: de um lado, as "empresas de fomento", representadas pelo avanço da fronteira agrícola e pecuária que são estimuladas por políticas públicas de incentivo ao desenvolvimento urbano, invasão de terras, construção de estradas, construção de hidrelétricas e hidrovias, e, por outro lado, podemos perceber o fator socioambiental, que se manifesta na manutenção de atores tradicionais neste cenário, que utilizam, sobretudo, o extrativismo como fonte de renda e subsistência. Esse extrativismo é marcado principalmente pela extração do látex e da colheita da castanha-do-pará, mas também por um histórico que inclui a extração de madeira, alteração do estilo de vida, dificuldades de acesso aos serviços de saúde e impactos ambientais (Silva, Muniz, 2009; Guerra *et al.*, 2019). Em Pernambuco, região com remanescentes de Mata Atlântica observa-se altas taxas de transmissão da LTA. A região apresenta particularidades que favorecem a disseminação da doença, como clima tropical úmido, atividades rurais (Brandão-Filho *et al.*, 1999) e acentuada desigualdade social, mostrando que as características de cada área passam a ser um fator na distribuição da doença (Scott, 2016).

Na última década, o estado de Minas Gerais vem apresentando aumento no número de casos de LTA (Temponi *et al.*, 2018), estando esses, concentrados nas mesorregiões do Norte

de Minas, Noroeste de Minas, Vale do Jequitinhonha, Vale do Mucuri e Vale do Rio Doce (Cardoso *et al.*, 2019), sendo esta última mesorregião onde está situado o município de Caratinga. Um dos fatores que podem ter contribuído para o aumento dos casos da doença no estado é a descontinuidade do Serviço de Vigilância Epidemiológica em diversas regiões do estado a exemplo o município de Caratinga. Outro fator importante, que contribui para o aumento dos casos da doença no estado é a expansão da presença de flebotomíneos. Com a presença do vetor em diversas áreas, o ciclo de transmissão pode ser facilmente estabelecido e levar ao aumento das taxas de incidência da LTA em humanos. Além disso, a presença de espécies vetoras em áreas urbanas é um fator importante na expansão da doença, conforme relatado para Minas Gerais (Nascimento *et al.*, 2013).

Ao longo dos últimos anos, nosso grupo vem desenvolvendo pesquisas ecoepidemiológicas em várias localidades, não só do estado de Minas Gerais, mas também em outras áreas do país. Trabalhos supervisionados pelo grupo mostram espécies de animais silvestres infectadas com *L. braziliensis* e outros estudos apontam a importância de pequenos mamíferos silvestres como hospedeiros naturais para diferentes espécies de *Leishmania*, e seus papéis na manutenção do ciclo de transmissão da LTA (Marcelino *et al.*, 2011, Quaresma *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2017; Castro *et al.*, 2020). No estudo de Ferreira *et al.*, (2015) curiosamente, as principais espécies de mamíferos encontradas parasitadas por *Leishmania* spp foram o *Rattus rattus* e o *Mus musculus*, roedores com hábitos de proximidade com humanos. Em diferentes regiões de Minas Gerais, estudos realizados pelo grupo identificaram a presença de várias espécies de flebotomíneos. Com a presença do vetor em diversas áreas, o ciclo da doença pode ser facilmente estabelecido e levar ao aumento nas taxas de incidência (Margonari *et al.*, 2010; Rêgo *et al.*, 2015; Tonelli *et al.*, 2017).

Faz-se necessário conhecer a ecologia da LTA e investigar o papel dos reservatórios e vetores dos causadores da doença, além da elaboração políticas educacionais em saúde por meio da participação em programas comunitários cabendo à equipe de Vigilância em Saúde identificar e monitorar unidades territoriais de relevância epidemiológica (Vieira *et al.*, 2014). Neste contexto, os Sistemas de Informações Geográficas (SIGs) e as análises espaciais, tendo em vista sua utilidade em termos de compreensão e visualização do comportamento epidemiológico de doenças como as leishmanioses, se mostram ferramentas importantes para atingir esses objetivos tanto no Brasil como em outros países (Shimabukuro *et al.*, 2010; Margonari *et al.*, 2012). Devido às suas características ocupacionais e ambientais, estudos espaciais sobre a LTA, feitos na América Latina, mostraram diferenças específicas de acordo com o país (Maia-Elkhoury *et al.*, 2016). Em geral, a transmissão da LTA é afetada por vários

fatores, incluindo degradação ambiental, atividades de trabalho, proliferação de vetores e proximidade com os cursos d'água (Confalonieri, Margonari, Quintão, 2013; Menezes *et al.*, 2015). Cabe ressaltar que as áreas escolhidas para as coletas entomológicas no Córrego Volta Grande, distrito de Patrocínio de Caratinga fazem divisa com o curso d'água que dá o nome a região.

Embora a maioria dos estudos tenha mostrado uma correlação entre gênero e exposição ocupacional em várias localidades estudadas (Gil *et al.*, 2010; Maia-Elkhoury *et al.*, 2016), esses resultados podem não ser claros em outras (Maia-Elkhoury *et al.*, 2016). Apesar da LTA estar relacionada a áreas florestais, os Sistemas de Informações Geográficas (SIG's) encontraram áreas peridomiciliares e urbanas de transmissão em potencial no norte da Argentina (Salomón *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2010). No Brasil, embora a maioria dos casos de LTA ocorram na Região Amazônica, os cenários epidemiológicos variam amplamente no país, como por exemplo, a região do Vale do Rio Doce. No norte do estado do Pará, os principais fatores de risco associados à transmissão da LTA foram o desmatamento e a proliferação de flebotomíneos (Gonçalves *et al.*, 2019). No estado do Acre, o padrão de transmissão varia dentro do estado (Melchior, 2017). Em algumas áreas, ocorre transmissão intra e peridomiciliar, enquanto em outras há um ciclo silvestre. No sudeste do estado de São Paulo, vários estudos de análise espacial foram realizados em diferentes cidades, incluindo Teodoro Sampaio, Bauru e Campinas (Nasser, Donalisio, Vasconcelos, 2009; Souza *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2014). É interessante notar que, dependendo da cidade, pode-se ter transmissão peridomiciliar/urbana, silvestre ou ambas. Essa análise não foi realizada no município de Caratinga, um dos locais com alta prioridade em Minas Gerais para a LTA.

Com base no que foi exposto, este trabalho analisou a distribuição espacial e temporal da LTA e avaliou alguns parâmetros ecoepidemiológicos da doença no município de Caratinga após um intervalo de quase duas décadas sem informações sobre a dinâmica desta doença.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Os estudos acima mencionados foram muito importantes para entender vários aspectos epidemiológicos da LTA no Novo Mundo. Esse conhecimento foi aplicado a outras regiões e em países da América Latina. Infelizmente, no início dos anos 2000, o Centro de Referência de Leishmaniose em Caratinga foi fechado e os estudos sobre LTA cessaram. Os pacientes continuaram sendo encaminhados ao sistema público de saúde da cidade. No entanto, uma lacuna importante permanecia nas últimas duas décadas, uma vez que nenhuma informação

sobre a dinâmica da doença foi relatada. Neste trabalho, utilizamos as ferramentas de análise espacial no município de Caratinga, Minas Gerais para avaliar o status de transmissão da LTA neste período.

Com base no que foi exposto, este trabalho analisou a distribuição espacial e temporal da LTA e avaliou alguns parâmetros ecoepidemiológicos da doença no município de Caratinga após um intervalo de quase duas décadas sem informações sobre a dinâmica desta doença.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Geral**

Analisar o padrão espaço – temporal da LTA no município de Caratinga e avaliar alguns parâmetros ecoepidemiológicos desta doença.

### **4.2 Específicos**

- Realizar levantamento histórico de dados sobre LTA na região de Caratinga entre 2007 – 2021;
- Identificar as espécies de flebotomíneos e detectar a infecção por *Leishmania* nas áreas: urbana, rural e de transição;
- Analisar a distribuição espacial de vetores e de casos humanos de LTA entre 2021 e 2021.

## **5 METODOLOGIA**

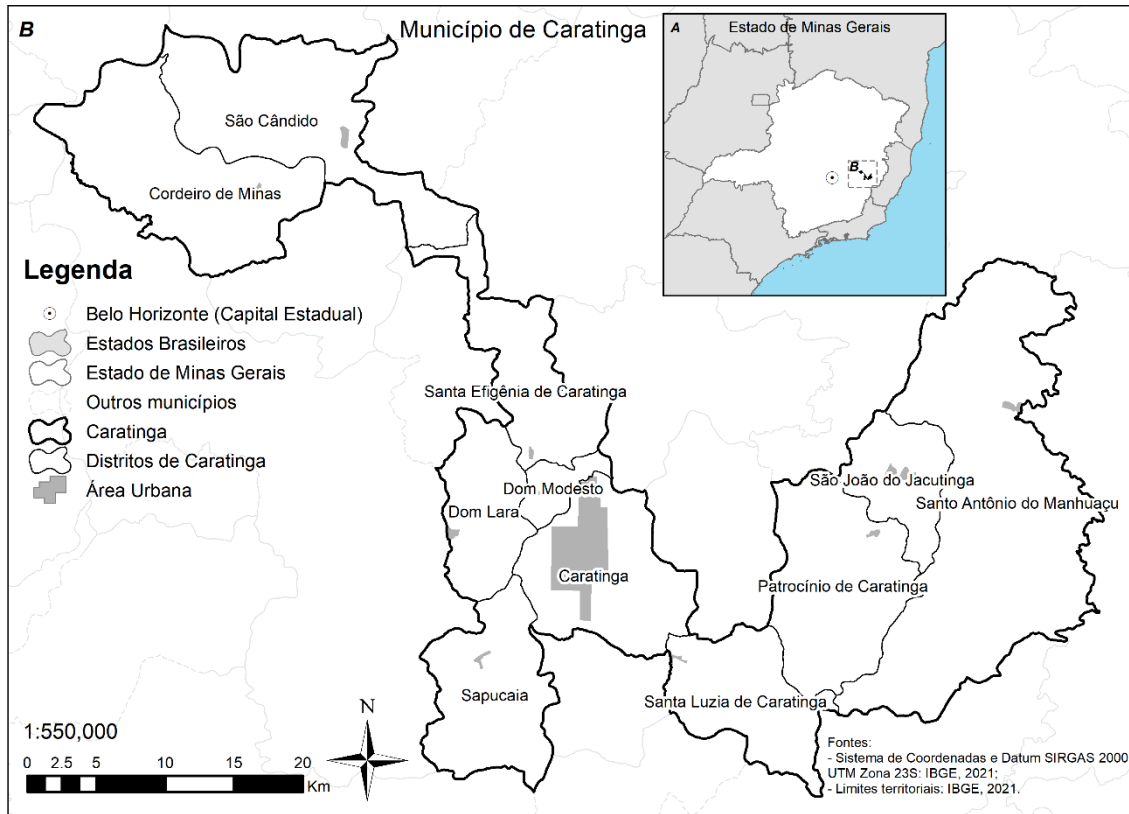
### **5.1 Aspectos éticos**

O estudo foi realizado em concordância com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa com seres humanos, mediante aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas. Parecer número: 3.997.721, CAAE: 26060619.5.0000.5091 (Anexo 3). As coletas entomológicas feitas neste estudo estão autorizadas pela licença permanente para coleta de material zoológico número 15237-2 (Anexo 4).

O projeto foi realizado em parceria com a Prefeitura de Caratinga, que deu suporte para o desenvolvimento da pesquisa e todos os procedimentos foram supervisionados por profissionais capacitados (Anexos 5A e 5B). Todos os casos de LTA diagnosticados pela equipe do projeto foram encaminhados para tratamento e acompanhamento adequados, independente de terem sido incluídos na investigação.

### **5.2 Área de estudo**

O município de Caratinga (19°47'25" S e 42°8'21"W) está localizado no Vale do Rio Doce cerca de 310 km a leste de Belo Horizonte, Minas Gerais (Figura 1A). O município ocupa uma área de 1.258,479 km<sup>2</sup>, dos quais 15,9 km<sup>2</sup> correspondem ao perímetro urbano, com uma população, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021), de 93.124 habitantes e densidade demográfica de 67,72 habitantes/km<sup>2</sup> (IBGE, 2010). Destaque do Produto Interno Bruto (R\$ 19.499,82), para as áreas da indústria e serviços, com a agricultura e a pecuária também representando participação relevante principalmente com a produção de café. Caratinga compreende dez distritos: Cordeiro de Minas, Dom Lara, Dom Modesto, Patrocínio de Caratinga, Santa Efigênia de Caratinga, Santa Luzia de Caratinga, Santo Antônio do Manhuaçu, Sapucaia, São Cândido e São João do Jacutinga (Figura 1B).



**Figura 1:** Localização do município de Caratinga no Estado de Minas Gerais, região do Vale do Rio Doce (A) e localização dos dez distritos que compõem o município de Caratinga (B).

### 5.3 Delineamento do estudo

Para selecionar a área de estudo no município de Caratinga foi solicitado à Secretaria Municipal de Saúde todas as Fichas de Investigação de Leishmaniose Tegumentar Americana do período de janeiro de 2007 a dezembro de 2021. Após a autorização, um termo de sigilo foi assinado (Anexo 6), sendo que as informações referentes aos dados individuais não foram acessadas. Utilizamos aqui somente as informações de interesse da pesquisa. Neste trabalho, realizamos análises entre 2007 – 2018 (Artigo 1, Neves *et al.*, 2021) e posteriormente acrescentamos o triênio de 2019 – 2021 com a inclusão de outras análises (Artigo 2, Neves *et al.*, submetido). Para fins didáticos, optamos por incluir as análises totais entre 2007 – 2021 como produto final da tese e os dois artigos podem ser encontrados nos anexos 1 e 2.

## 5.4 Análise dos dados

A análise foi feita com base nos dados das fichas fornecidas pelo Serviço Municipal de Saúde e utilizou as seguintes variáveis: Data da Notificação, Data do Diagnóstico, Data de Nascimento, Idade, Sexo, Raça/Cor, Escolaridade, Distrito, Bairro, Logradouro, Número, Complemento, Zona, Data da Investigação, Ocupação, Presença de Lesão, Co-infecção HIV, Realização de Parasitológico Direto, Intradermorreação de Montenegro (IRM), Histopatologia, Tipo de Entrada, Forma Clínica, Data do Início do Tratamento, Droga Inicial Administrada, Peso, Dose Prescrita em mg/kg/dia Sb<sup>5+</sup>, Número Total de Ampolas Prescritas, Outra Droga Utilizada, Critério de Confirmação, Classificação Epidemiológica, Doença Relacionada ao Trabalho, Evolução do Caso, Data do Óbito e Data do Encerramento.

Foi feito o cálculo da taxa de incidência anual utilizando a população referente a cada ano obtida do IBGE. Após a realização desta etapa, o número de casos obtidos nos formulários foi agrupado em triênios (2007 - 2009; 2010 - 2012; 2013 - 2015; 2016 - 2018 e 2019 - 2021) para posterior cálculo das taxas de incidência para cada período de três anos. Os cálculos de incidência acumulada foram realizados por meio do software GeoDa versão 1.14 (ASU, GeoDa Center for Geospatial Analysis and Computation, Arizona, EUA).

## 5.5 Análise espacial

A realização da análise espacial, bem como dos cálculos de incidência acumulada descritos no item 3.4, foram desenvolvidos em colaboração com os pesquisadores MSc. Diogo Tavares Cardoso e Dr. David Soeiro Barbosa do Departamento de Parasitologia, e Dr. Fabrício Thomaz de Oliveira Ker do Laboratório de Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias, pertencentes ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Nesta parte do estudo utilizamos as técnicas de Elipse, Densidade de Kernel e a análise de varredura de aglomerados espaço-temporal – Satscan. Para analisar a distribuição espacial dos casos de LTA no município de Caratinga no período estudado foram utilizados os agrupamentos por triênio.



### 5.5.1 Elipse

Esta técnica identifica locais com casos. Esta identificação é realizada por meio do desenho de uma elipse, marcando as condições de tendência central, dispersão e tendência de direção. A Elipse de Distribuição Direcional mostra a distribuição espacial dos eventos em dois sentidos: identificação de aglomerados e orientação. O eixo maior define a direção de máxima dispersão da distribuição, enquanto o menor é perpendicular ao eixo anterior e define a mínima dispersão (Yuill, 1971). Esta ferramenta transforma a distribuição aleatória dos casos de LTA em uma elipse. A aplicação da Elipse de Distribuição Direcional foi feita utilizando o software ArcMap 10.6.1.

### 5.5.2 Densidade de Kernel

A densidade de Kernel é um método estatístico de interpolação que identifica o nível de agrupamentos sobre uma doença. Com esta ferramenta cada observação é ponderada de acordo com uma distância central o que cria uma superfície contínua que representa a densidade na qual os *hotspots* foram destacados. Para avaliação da densidade foi estipulado um raio de influência de 600m (Bailey, Gatrell, 1995) sendo a densidade dos mapas para cada triênio padronizada em categorias. Áreas com densidade maior que zero ( $>0$ ) foram sucessivamente sobrepostas para avaliar a área afetada e o número de triênios positivos. O software ArcMap 10.6.1, foi utilizado para a realização desta análise.

### 5.5.3 Análise de varredura de aglomerados espaço-temporal – Satscan

Estatísticas de varredura são utilizadas para detectar e avaliar aglomerados de casos em uma configuração espaço-temporal. Isso é feito pela varredura gradual da informação no espaço e no tempo, assinalando o número de eventos observados e esperados no interior de cada unidade de análise (Pellegrini, Kulldorff, 2016). Para esta análise foi utilizado o software SaTScan 9.4.4 (Kulldorff, 2016).

As análises foram realizadas utilizando o conjunto de dados dos casos notificados, a população e a localização. Para a realização dos testes, foram inseridas no software as informações referentes a cada setor censitário, número de casos com data de diagnóstico, população por setor censitário e coordenadas geográficas dos setores censitários. Todas as

informações foram inseridas para todo o período de estudo. As informações sobre população por setor censitário foram obtidas do IBGE (IBGE, 2010).

A identificação dos aglomerados espaço-temporal foi feita por meio do modelo discreto de Poisson. Este modelo avalia se a quantidade de casos em cada localidade segue a distribuição de Poisson que podem ser analisados com as estatísticas de varredura no modelo espaço-temporal (Kulldorff, 2016). Para a realização da estatística de varredura foram utilizadas as seguintes configurações: período de estudo 2007 - 2018, não ocorrência de sobreposição geográfica dos aglomerados, aglomerados de tamanho máximo igual a 50% da população exposta, conjuntos circulares e 999 repetições, tamanho máximo dos aglomerados temporais igual a 50% do período de estudo e a precisão do tempo estava padronizada em um ano (Abrams, Kleinman, 2007).

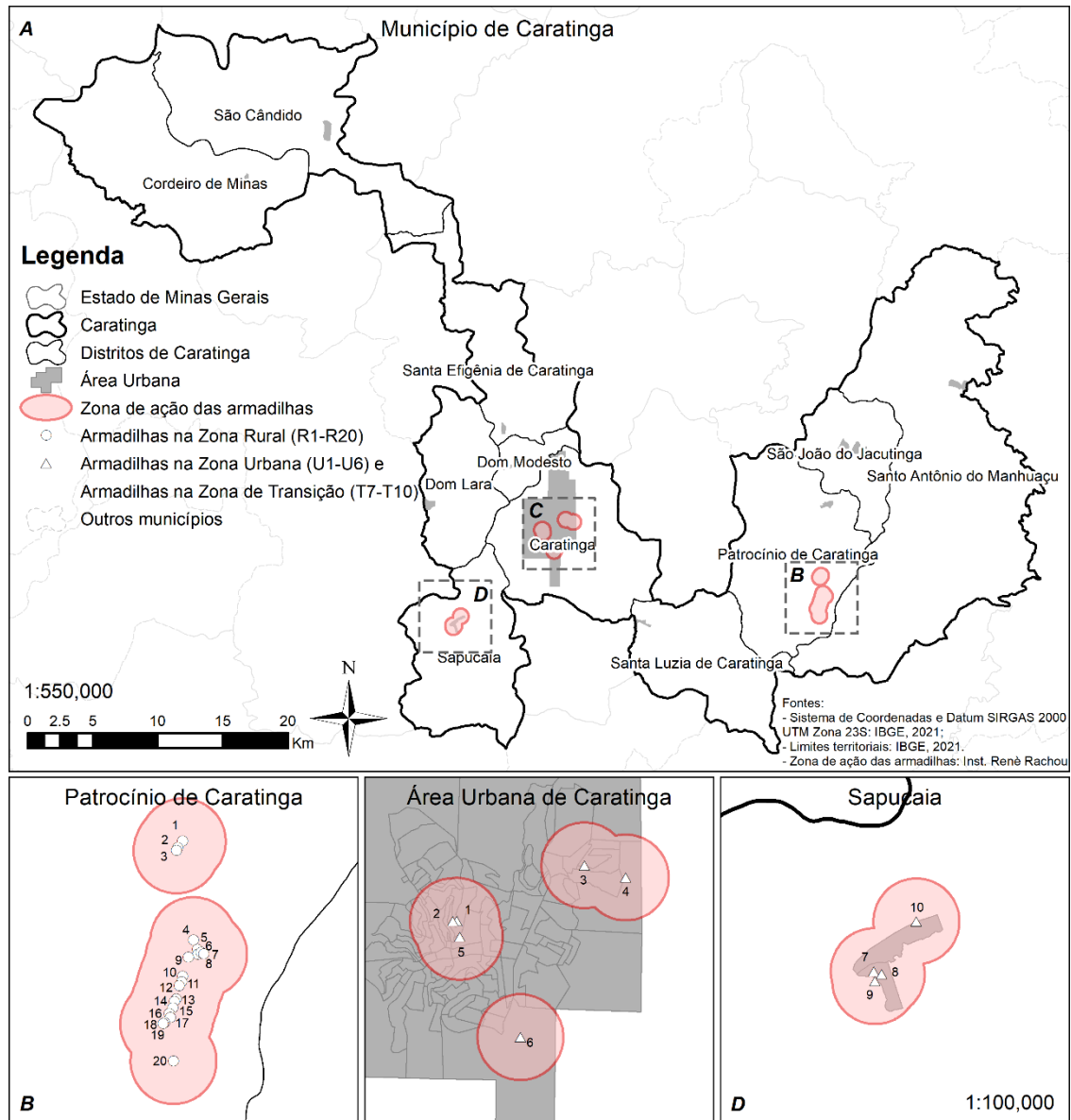
As técnicas de varredura espaço-temporal foram configuradas para detectar aglomerados de alto e baixo risco para a transmissão de *Leishmania*. O teste de significância dos aglomerados identificados baseou-se na comparação de uma distribuição nula obtida pela simulação de Monte Carlo. Para que diferentes áreas pudessem ser comparadas entre si, o programa apresentou o Risco Relativo (RR) de cada aglomerado, que representa a relação ao risco de ocorrência do agravo dentro do aglomerado em relação a quem está fora dele (Pellegrini, Kulldorff, 2016). A análise de varredura de aglomerados espaço-temporal realizada neste estudo considerou todo o município de Caratinga.

## 5.6 Estudos dos flebotomíneos

Foram realizadas, coletas entomológicas com o objetivo de conhecer a composição da fauna flebotomínica local, detectar e identificar as espécies de *Leishmania* presentes nas fêmeas capturadas no município de Caratinga, durante os anos de 2020 e 2021, nos meses de janeiro, março, maio, julho, setembro e novembro de cada ano (Figura 2A).

Em 2020, foram selecionados 20 pontos de coleta (R1 - R20) na área do Córrego Volta Grande (zona rural), distrito de Patrocínio de Caratinga (Figura 2B). A escolha desta localidade se deve ao maior número de casos registrados durante todo o período de análise. Já no ano de 2021, foram selecionados dez pontos de amostragem, sendo seis na área urbana (zona urbana, U1 – U6) de Caratinga nos bairros Anápolis e Esplanada (duas armadilhas cada), Centro e Limoeiro (uma armadilha cada) (Figura 2C), e quatro pontos amostrais na área de transição (Sanguinette *et al.*, 2015) (zona de transição, T7 – T10) no distrito de Sapucaia (Figura 2D).

Essas áreas foram escolhidas com base nos casos de LTA notificados na área urbana de Caratinga e no aumento dos casos em Sapucaia.



**Figura 2:** Áreas de coleta entomológica no município de Caratinga durante os anos de 2020 e 2021 (A); pontos de coleta no Córrego Volta Grande, Patrocínio de Caratinga (zona rural, R1 – R20) (B); pontos de coleta na área urbana de Caratinga (zona urbana, U1 – U6) (C) e pontos de coleta na área de transição do distrito de Sapucaia (zona de transição, T7 – T10) (D).

Foram instaladas armadilhas luminosas automáticas modelo HP (Pugedo *et al.*, 2005), em cada área selecionada, para a captura de insetos, cuja luz artificial é mantida como isca. Quatro pilhas grandes (1,5 volt cada) foram utilizadas como fonte de energia tanto para a luz quanto para o motor, que mantém o fluxo de ar direcionado para uma gaiola de tecido onde os insetos ficaram acondicionados. As armadilhas foram expostas durante dois dias consecutivos.

O acondicionamento dos espécimes capturados foi feito em tubo Falcon de 50 ml contendo álcool glicerinado após o período de exposição da armadilha.

Todos os pontos de coleta foram georreferenciados, *in loco*, utilizando-se um aparelho GPS (Global Positioning System) marca Garmin E-Trex e posteriormente apresentados em mapas, para a análise da distribuição espacial, utilizando o software ArcMap.

Os flebotomíneos foram preparados e montados entre lâmina e lamínula, utilizando-se bálsamo do Canadá para os machos, e líquido de Berlese para as fêmeas, de acordo com a técnica de Langeron (1949). A identificação específica dos flebotomíneos foi feita com a observação por microscopia ótica dos caracteres morfológicos internos e externos, seguindo a classificação proposta por Galati (2003). A abreviação do nome das espécies neste estudo seguiu a proposta de Marcondes (2007).

Os dados geoespaciais foram obtidos com o navegador portátil GPS Garmin® eTrex Venture HC, transferidos para o software MapSource® Trip & Waypoint Manager. Os dados obtidos ao longo de toda a coleta entomológica foram submetidos à análise de Kernel, onde foi possível calcular a magnitude e ajustar a distribuição e abundância de casos de LTA, vetores e insetos infectados.

### **5.6.1 Avaliação da diversidade e similaridade da fauna flebotomínica**

Para avaliar a fauna de flebotomíneos foram calculados índices de diversidade e similaridade das espécies em cada ponto e em cada área de coleta, respectivamente. Foram analisados os seguintes parâmetros: riqueza dos táxons (S), abundância individual (N), Índice de Simpson (1-D) que é utilizado para medir a diversidade de uma comunidade, Índice de Shannon-Weiner (H) que quantifica a biodiversidade específica, Índice de Equitabilidade de Pielou (J) e Índice de Biodiversidade Margalef, que visa estimar a biodiversidade de uma comunidade com base na distribuição numérica dos indivíduos das diferentes espécies em função do número total de indivíduos existentes na amostra analisada. Posteriormente, a similaridade foi avaliada por meio da análise de agrupamento hierárquico, utilizando os valores obtidos com o Índice de Jaccard (Chao *et al.*, 2005).

## 5.7 Estudos moleculares

Para determinar a infecção dos flebotomíneos e dos casos humanos, as amostras de DNA extraídas foram analisadas pela técnica de PCR dirigida ao *ITS I* de *Leishmania* (El Tai *et al.*, 2000), que amplifica um fragmento de aproximadamente 300 a 350 pb (Schonian *et al.*, 2003), seguida do sequenciamento do fragmento amplificado. A identificação da fonte alimentar no intestino das fêmeas alimentadas foi realizada pela técnica de PCR dirigida ao gene citocromo B (CytB) (Boakye *et al.*, 1999), seguida da amplificação e sequenciamento do fragmento obtido de aproximadamente 384 pb.

### 5.7.1 Extração do DNA das fêmeas de flebotomíneos para detecção da infecção por *Leishmania spp.*

As fêmeas que não apresentarem sinais de repasto sanguíneo em seu abdômen foram identificadas pela montagem da cabeça em posição ventral e terminália (últimos três segmentos abdominais) em lâmina e lamínula com líquido de Berlese. As fêmeas foram dispostas em "pools" contendo no máximo dez espécimes da mesma espécie, localidade e data de coleta para a realização da extração de DNA e posterior pesquisa de *Leishmania spp.*

A extração foi realizada, utilizando o kit de extração de tecido e células Genra Puregene® da QIAGEN, seguindo o protocolo modificado por Quaresma *et al.*, (2011): as fêmeas de flebotomíneos foram maceradas em 100 µL de solução de lise celular (para uma fêmea) ou 200 µL (para *pool* de até dez fêmeas) e à mistura foi adicionado 1 µL de proteinase K (para uma fêmea) ou 1,5 µL (para o *pool*). A solução foi homogeneizada por inversão do tubo e incubada a 55°C durante a noite. Após o período de incubação, foi adicionado 1 µL de RNase (para uma fêmea) ou 1,5µL (para o *pool*) à solução, que foi homogeneizada por inversão e incubada a 37° C por trinta minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas no gelo por três minutos e adicionadas 100 µL de solução de precipitação de proteínas. Os tubos foram agitados em vórtex por 20 segundos a alta velocidade seguido de centrifugação por cinco minutos a 12000 x g (14000 rpm), e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 300 µL de isopropanol vertendo cuidadosamente por inversão à amostra remanescente, seguida de outra centrifugação por cinco minutos a 12000 x g (14000 rpm). Após este passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo invertido e seco em papel absorvente. Etanol a 70% foi adicionado ao tubo já seco, seguido de outra centrifugação a 12000 x g (14000rpm) por cinco minutos. Por fim o sobrenadante foi descartado e o tubo permaneceu invertido contra

um papel absorvente para secar até não sobrar nenhum resquício de álcool. Ao final, foi adicionado 25 µL de solução de hidratação de DNA ou água DNase e RNase *free* (para uma fêmea) ou 40 µL (para *pool* de dez fêmeas). As amostras foram incubadas a 65°C por uma hora e posteriormente deixadas à temperatura ambiente durante a noite, sendo estocadas ao final à temperatura de -20°C.

Após a extração foi realizada a dosagem de porções de DNA em amostras sorteadas aleatoriamente, verificando a presença, concentração e qualidade do material extraído. Para este procedimento foi utilizado o espectrofotômetro de microvolume Nanodrop®-1000. Conforme recomendações do fabricante o espectro de luz foi ajustado para 260 e 280 nanômetros, faixa em que os ácidos nucleicos são detectados. A razão da absorbância de 260nm/280nm foi utilizada para avaliar a pureza do material extraído, sendo considerados aceitáveis valores entre 1,4 de 1,8. Valores menores que a margem, podem indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes provenientes do processo de extração.

### **5.7.2 Extração do DNA das amostras obtidas de casos humanos para detecção da infecção por *Leishmania* spp**

O estudo foi conduzido considerando duas abordagens: i) os casos suspeitos de LTA encaminhados à Policlínica municipal de Caratinga para avaliação; ii) busca ativa de indivíduos com lesões suspeitas na área de estudo. Foi selecionado um total de 30 indivíduos com diagnóstico confirmado para LTA, residentes na área de estudo.

Os indivíduos, com diagnóstico confirmado e maiores de 18 anos (exceção de mulheres gestantes e nutrízes), foram convidados a participar da pesquisa mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 5).

Todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa foram convidados a realizar os seguintes procedimentos: entrevista individual, realização de exame clínico e biópsia, das lesões sugestivas de LTA.

O material coletado das lesões foi destinado para a realização do diagnóstico parasitológico e molecular para a identificação da espécie de *Leishmania*. A coleta das amostras biológicas foi feita pela médica do Serviço de Saúde da Prefeitura de Caratinga: Dra Pollyana Anarely Pinto Lucas, CRM MG: 52661.

Para a realização da coleta do material, inicialmente o local da ferida foi anestesiado com lidocaína 2% sem vasoconstritor, aplicada por infiltração exclusivamente no local onde foi realizado a biópsia. A biópsia foi realizada retirando-se um fragmento da borda da lesão, com

o auxílio de um “*punch*” estéril e descartável de 5,0 mm de diâmetro. O fragmento foi depositado sobre um cartão de papel filtro para se retirar o excesso de sangue. O fragmento foi utilizado para impregnar duas ou três lâminas para pesquisa de amastigotas com auxílio de microscopia ótica. Este fragmento foi armazenado em criotubos para ser utilizado posteriormente como fonte de DNA para os procedimentos moleculares, sendo mantidos a -20°C até sua utilização no laboratório do Grupo de Estudos em Leishmanioses do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, Belo Horizonte.

As lâminas contendo a impressão do fragmento da lesão foram fixadas com metanol e coradas pela Coloração de Giemsa, para a pesquisa das formas amastigotas de *Leishmania*. A leitura das lâminas foi feita com o microscópio ótico, sendo considerado positivo quando forem visualizadas as formas amastigotas do parasito.

Os casos confirmados foram encaminhados para tratamento. Caso algum indivíduo tenha se manifestado contra a continuidade das atividades de coleta de amostras biológicas e de dados relacionados diretamente a ele, foi mantido o seu direito de excluir-se do estudo, bem como se algum dos órgãos participantes solicitar a interrupção da pesquisa por motivos considerados relevantes.

Conforme abordado neste item o material biológico foi armazenado somente até o fim da pesquisa correspondente, sendo que ao encerramento, foi descartado. As amostras foram armazenadas nos equipamentos do Grupo de Estudos em Leishmaniose, Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, sob responsabilidade da Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo.

### **5.7.3 PCR dirigida ao *Internal Transcribed Spacer I (ITS I)* do rDNA**

Para a amplificação das amostras de DNA, dos flebotomíneos e do material humano, foi utilizado o par de iniciadores LITSR: 5´ CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3´ e L5.8S: 5´ TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3´. A reação foi preparada para um volume final de 25 µL contendo 5 µL de DNA da amostra a ser testada, 2,5 µL da solução tampão 10x, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5 µL de dNTP mix a 10 mM, 1,25 µL de cada um dos iniciadores (LITSR e L5.8R) a 10 µM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase a 10 UI/µL, 1,25 µL de DMSO e 12,25 µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler Gradient, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguido de 35 repetições de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos.

A extensão final foi a 72°C por dez minutos. Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 ng de DNA extraído de cepas referência de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e *L. major* (MHOM/BR/1971/BH121), e como controle negativo foi utilizado água destilada estéril. As amostras positivas foram submetidas a digestão pela enzima de restrição *HaeIII* conforme descrito por Schonian *et al.*, (2003).

Os resultados foram visualizados em gel de agarose 2,0% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV), sendo consideradas positivas aquelas amostras que apresentarem banda de peso molecular correspondente ao esperado, 300-350pb, utilizando o peso molecular (PM) de 100pb.

#### **5.7.4 Identificação das fontes de repasto sanguíneo em fêmeas de flebotomíneos**

O procedimento foi realizado seguindo o protocolo descrito por Carvalho *et al.*, (2017). As reações foram preparadas em tampão 1x de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, primers direto e reverso 10 mM, 1U/μl Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 5 μl de modelo de DNA para o volume de 25 μl. O controle positivo para as reações de PCR consistiu de DNA extraído de *Canis familiaris*. Flebotomíneos machos da espécie *Nyssomyia whitmani*, obtidos do pool de amostras do laboratório, foram usados como controles negativos em todas as extrações de DNA. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (10 mg/ml) com um DNA Step Ladder de 100 pb. Os amplicons obtidos foram removidos do gel de agarose sob exposição UV e purificados por um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). As amostras foram então sequenciadas com ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) em um volume final de 10 μl com ~50 ng dos produtos de PCR purificados e 3,3 pmol dos primers direto e reverso. O software FinchTV (Geospiza Inc., Seattle, WA) foi usado para verificar manualmente os eletroferogramas e o software SeqTrace35 foi usado para alinhar e calcular as sequências para regiões de similaridade com as sequências do GenBank pela Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). A identificação das espécies extraídas das amostras de sangue foi considerada correta quando as sequências apresentaram mais de 87% de identidade para pelo menos 94% da sequência analisada.



## 6 RESULTADOS

### 6.1 Análise de dados

As análises das variáveis citadas no tópico 3.4 estão apresentadas nas tabelas de 1 a 4.

Diante do exposto na Tabela 1, é possível observar que dos 428 casos de LTA notificados em Caratinga durante o período de estudo, 253 são do sexo masculino e 175 do sexo feminino, correspondendo a 59,11% e 40,89%, respectivamente. A frequência variou de acordo com a faixa etária, sendo 20,16% entre indivíduos do sexo masculino com idade entre 11 a 20 anos e 17,71% entre o sexo feminino com idade entre 31 a 40 anos. A frequência total com relação a idade foi de 17,99% na faixa de 11 a 20 para ambos os sexos. A média de idades foi de 33 anos para homens e 35 anos para mulheres. Do total de indivíduos, 65,89% possuem baixa escolaridade (analfabetos, ensino fundamental incompleto e completo) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Dados sociodemográficos dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga, Minas Gerais, notificados no período de 2007 a 2021.

<b>Variáveis</b>	<b>n (%)</b>		<b>%</b>
<b>Gênero</b>			
Masculino	253		59,11
Feminino	175		40,89
<b>Idade (anos) por gênero</b>			
	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>	
<1	2 (0,79)	0 (0)	0,47
1-10	22 (8,70)	24 (13,71)	10,75
11-20	51 (20,16)	26 (14,86)	17,99
21-30	37 (14,62)	27 (15,43)	14,95
31-40	37 (14,62)	31 (17,71)	15,89
41-50	33 (13,04)	25 (14,29)	13,55
51-60	36 (14,23)	15 (8,57)	11,92
61-70	26 (10,28)	16 (9,14)	9,81
71-80	8 (3,16)	4 (2,29)	2,80
≥81	1 (0,40)	7 (4,00)	1,87
<b>Cor</b>			
Amarela	5		1,17
Branca	232		54,21
Parda	122		28,50
Negra	50		11,68
Não informada	19		4,44
<b>Escolaridade</b>			
Analfabeto	8		1,87
Ensino fundamental incompleto	243		61,92
Ensino fundamental completo	4		2,10
Ensino médio	2		1,17
Não se aplica*	19		5,84
Não informado	31		15,42
Ignorado	12		11,68

\* Crianças que não estão em idade escolar.

Segundo os dados das Fichas de Notificação, a cidade de Caratinga possui 88 casos registrados e o distrito de Patrocínio de Caratinga 167 (20,56 e 39,02% respectivamente). Outros distritos contribuíram com um menor número de casos, sendo sete em Cordeiro de Minas (1,64%), seis em Dom Lara (1,40%) e quatro em São Cândido (0,93%). Da totalidade dos registros, 80,84% foram registrados como pertencentes a zona rural. Observa-se ainda que os maiores números de casos de LTA foram registrados durante os anos de 2010 (13,08) e 2018 (10,98). Os meses de janeiro e março foram os que tiveram o maior número de casos notificados com 14,49% e 10,28%, respectivamente (Tabela 2).

Durante o período de 2007 a 2021, a localidade do Córrego Volta Grande situada na área rural do distrito de Patrocínio de Caratinga, concentrou o maior número de casos humanos em relação às demais áreas do município, sendo, portanto, o local escolhido para a continuidade do estudo.

**Tabela 2:** Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga por local de residência, zona, ano e mês do diagnóstico, no período de 2007 a 2021.

<b>Variáveis</b>	<b>n</b>					<b>%</b>
<b>Cidade/distrito</b>						
Caratinga	88					20,56
Cordeiro de Minas	7					1,64
Dom Lara	6					1,40
Dom Modesto	15					3,50
Patrocínio de Caratinga	167					39,02
Santa Efigênia	25					5,84
Santa Luzia	26					6,07
Santo Antônio do Manhuaçu	29					6,78
São Cândido	4					0,93
São João do Jacutinga	19					4,44
Sapucaia	42					9,82
<b>Zona/Triênio</b>	<b>2007-2009</b>	<b>2010-2012</b>	<b>2013-2015</b>	<b>2016-2018</b>	<b>2019-2021</b>	<b>Total (%)</b>
Periurbana	2	0	4	3	0	9 (2,10)
Rural	35	91	34	108	78	346 (80,84)
Urbana	6	11	9	16	31	73 (17,06)
<b>Ano do diagnóstico</b>						
2007	6					1,40
2008	19					4,44
2009	18					4,21
2010	56					13,08
2011	39					9,11
2012	7					1,64
2013	12					2,80
2014	9					2,10
2015	26					6,07
2016	41					9,58
2017	39					9,11
2018	47					10,98
2019	44					10,28
2020	46					10,75
2021	19					4,44
<b>Mês do diagnóstico</b>						
Janeiro	62					14,49
Fevereiro	34					7,94
Março	44					10,28
Abril	30					7,01
Maiο	27					6,31
Junho	26					6,07
Julho	34					7,94
Agosto	38					8,88
Setembro	32					7,48
Outubro	33					7,71
Novembro	31					7,24
Dezembro	37					8,64

A Tabela 3 apresenta os dados relacionados aos aspectos clínicos da LTA, conforme notificado a lesão cutânea foi a forma mais prevalente da doença (97,90%). Os casos registrados foram diagnosticados pelo exame parasitológico direto e Intradermorreação de Montenegro com 90,19% e 55,37% de positividade respectivamente. O exame histopatológico foi realizado em 13,79% dos indivíduos. A droga mais utilizada foi o Glucantime (76,87%) e 93,46% dos casos notificados evoluíram para a cura.

**Tabela 3:** Dados relacionados aos aspectos clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga, no período de 2007 a 2021.

<b>Variáveis</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b><u>Forma clínica</u></b>		
Cutânea	419	97,90
Mucosa	9	2,10
<b><u>Dados laboratoriais</u></b>		
<b><i>Parasitológico direto</i></b>		
Positivo	386	90,19
Negativo	26	6,07
Não realizado	16	3,74
<b><i>Intradermorreação de Montenegro</i></b>		
Positivo	237	55,37
Negativo	40	9,35
Não informado	151	35,28
<b><i>Histopatológico</i></b>		
Realizado	59	13,79
Não realizado	369	86,21
<b><u>Co-infecção com HIV</u></b>		
Sim	2	0,63
Não	333	85,89
Ignorado	93	13,48
<b><u>Droga utilizada</u></b>		
Glucantime	329	76,87
Anfotericina B	1	0,23
Outras	42	9,81
Não informado	56	13,08
<b><u>Doença relacionada ao trabalho</u></b>		
Sim	118	27,57
Não	201	46,96
Ignorado	69	16,12
Não informado	40	9,35
<b><u>Evolução do caso</u></b>		
Cura	400	93,46
Abandono	17	3,97
Óbito	1	0,23
Transferência	1	0,23
Não informado	9	2,10

A Tabela 4 mostra que os triênios de 2010 – 2012, 2016 – 2018 e 2019 – 2021 contribuíram com maior número de casos (102, 127 e 109 respectivamente). Já os períodos de 2007 – 2009 e 2013 – 2015 contribuíram com menor número de casos (43 e 47), respectivamente. Fica evidente que no triênio de 2016 – 2018 houve um aumento significativo no número de casos de LTA na região. Observa-se ainda que após o pico de casos de LTA em 2016 - 2018, a alta de casos se manteve em 2019 e 2020, com redução em 2021.

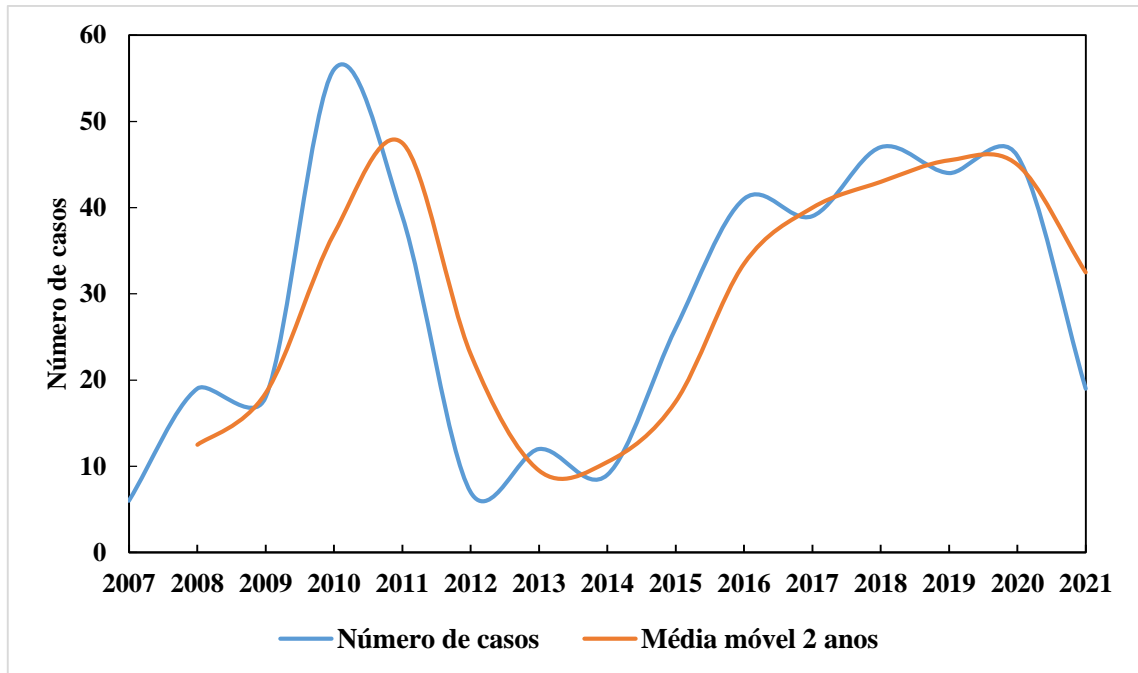
As taxas de incidência total por 10.000 habitantes variaram durante o período analisado de 0,72 em 2007 a 6,57 em 2010, ano com maior incidência. A incidência média no município de Caratinga foi de 4,74. Cabe ressaltar que as taxas de incidência no município de Caratinga foram calculadas com a população ano a ano e que a incidência por triênio foi calculada

somando-se os novos casos no período dividindo pela população mediana do período avaliado (Tabela 4).

Durante todo o período analisado observa-se que o ano de 2007 foi o ano com menor incidência e 2010 ano com maior incidência. Após esse período houve uma redução dos casos nos anos de 2012 até 2014 com um aumento após de 2015. Essa oscilação dos casos é possível ser observado também pela média móvel apresentada no Gráfico 1.

**Tabela 4:** Incidência dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por 10.000 habitantes no município de Caratinga no período de 2007 a 2021.

<b>Ano</b>	<b>n</b>	<b>População</b>	<b>Incidência</b>	<b>Incidência por triênio</b>
2007	6	83.363	0,72	
2008	19	84.825	2,24	
2009	18	85.469	2,11	
<b>2007 – 2009</b>	<b>43</b>			5,06
2010	56	85.239	6,57	
2011	39	85.811	4,54	
2012	7	86.364	0,81	
<b>2010 – 2012</b>	<b>102</b>			11,88
2013	12	89.578	1,34	
2014	9	90.192	1,00	
2015	26	90.782	2,86	
<b>2013 – 2015</b>	<b>47</b>			5,21
2016	41	91.342	4,49	
2017	39	91.841	4,25	
2018	47	91.503	5,14	
<b>2016 – 2018</b>	<b>127</b>			13,82
2019	44	92.062	4,78	
2020	46	92.603	4,97	
2021	19	93.124	2,04	
<b>2019 – 2021</b>	<b>109</b>			11,77
<b>Total</b>	<b>428</b>	<b>Média</b>	<b>4,74</b>	



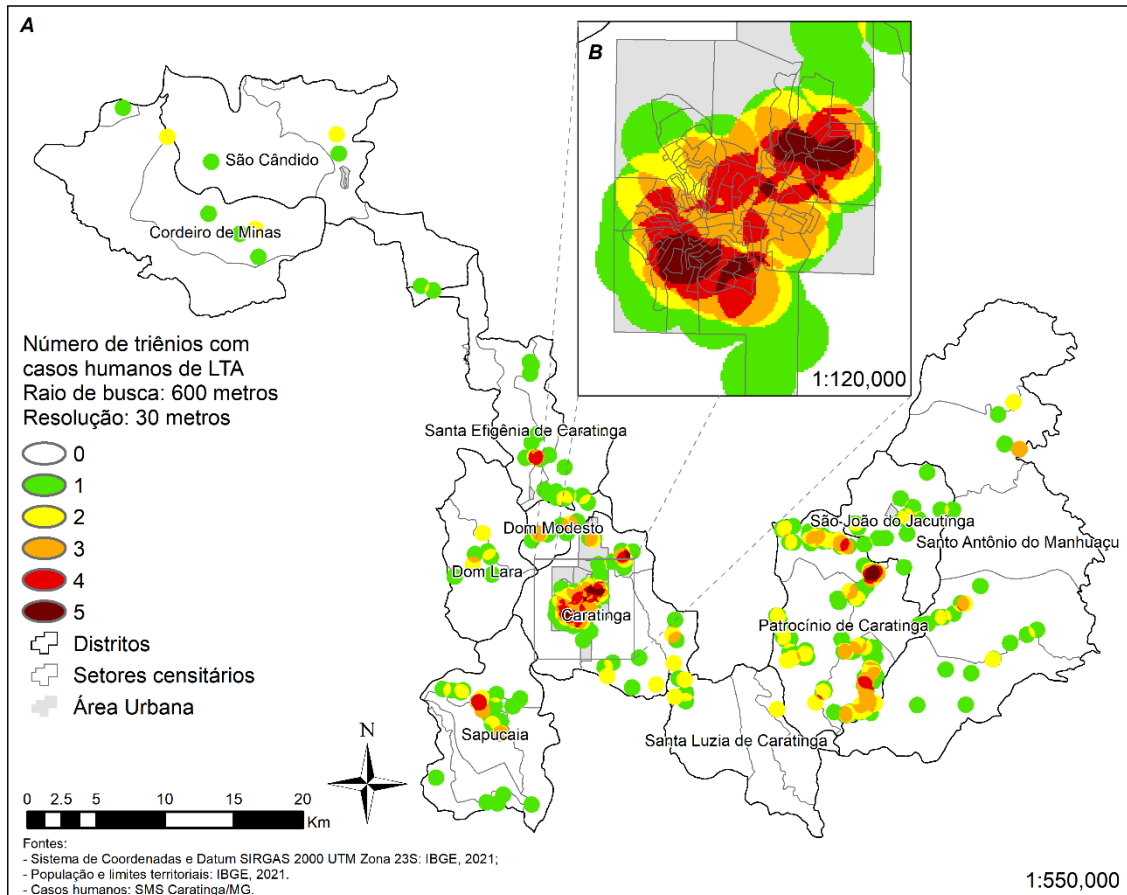
**Gráfico 1:** Média móvel dos casos de LTA no período de 2007 a 2021.

Ao longo de toda a série história, observa-se que de 2007 a 2018 o distrito de Patrocínio de Caratinga apresentou o maior número de notificações em relação às demais áreas do município de Caratinga. No triênio 2019 – 2021, a área urbana de Caratinga contribuiu com maior número de casos (25) em relação a Patrocínio de Caratinga (21). As demais áreas contribuíram com menor número de casos, com sete casos em Dom Modesto e Santa Efigênia, quatro casos em São João do Jacutinga, três casos em Cordeiro de Minas e, dois casos em Dom Lara e São Cândido. Com exceção de Dom Lara e São Cândido, os demais distritos desde 2013 – 2015 registram aumento contínuo no número de casos. Entre 2007 – 2015, cinco distritos não apresentaram casos de LTA em pelo menos um ano. No período de 2016 – 2021 todos os distritos tiveram casos (Tabela 5).

**Tabela 5:** Número de casos de LTA por cidade/distrito durante o período de 2007 a 2021.

Cidade/distrito	2007-2009	2010-2012	2013-2015	2016-2018	2019-2021
	n	n	n	n	n
Caratinga	10	22	11	20	25
Cordeiro de Minas	0	2	0	2	3
Dom Lara	1	0	1	2	2
Dom Modesto	1	2	1	4	7
Patrocínio de Caratinga	6	53	30	57	21
Santa Efigênia de Caratinga	5	8	1	4	7
Santa Luzia de Caratinga	1	1	0	9	15
Santo Antônio do Manhuaçu	3	10	1	5	10
São Cândido	0	0	1	1	2
São João do Jacutinga	6	1	1	7	4
Sapucaia	10	3	0	16	13
Total	43	102	47	127	109

As Figuras 3A e 3B, apresentam de forma simplificada os triênios com casos em relação às áreas acometidas. Observam-se locais específicos dentro dos distritos de Patrocínio de Caratinga, Sapucaia, Santa Efigênia, com ocorrências de quatro e cinco triênios consecutivos com registros de casos humanos de LTA (Figuras 3A). A situação é mais crítica na área urbana de Caratinga (Figura 3B), onde ocorrem áreas com alta frequência de casos de LTA nas regiões nordeste, centro e sudoeste da cidade.

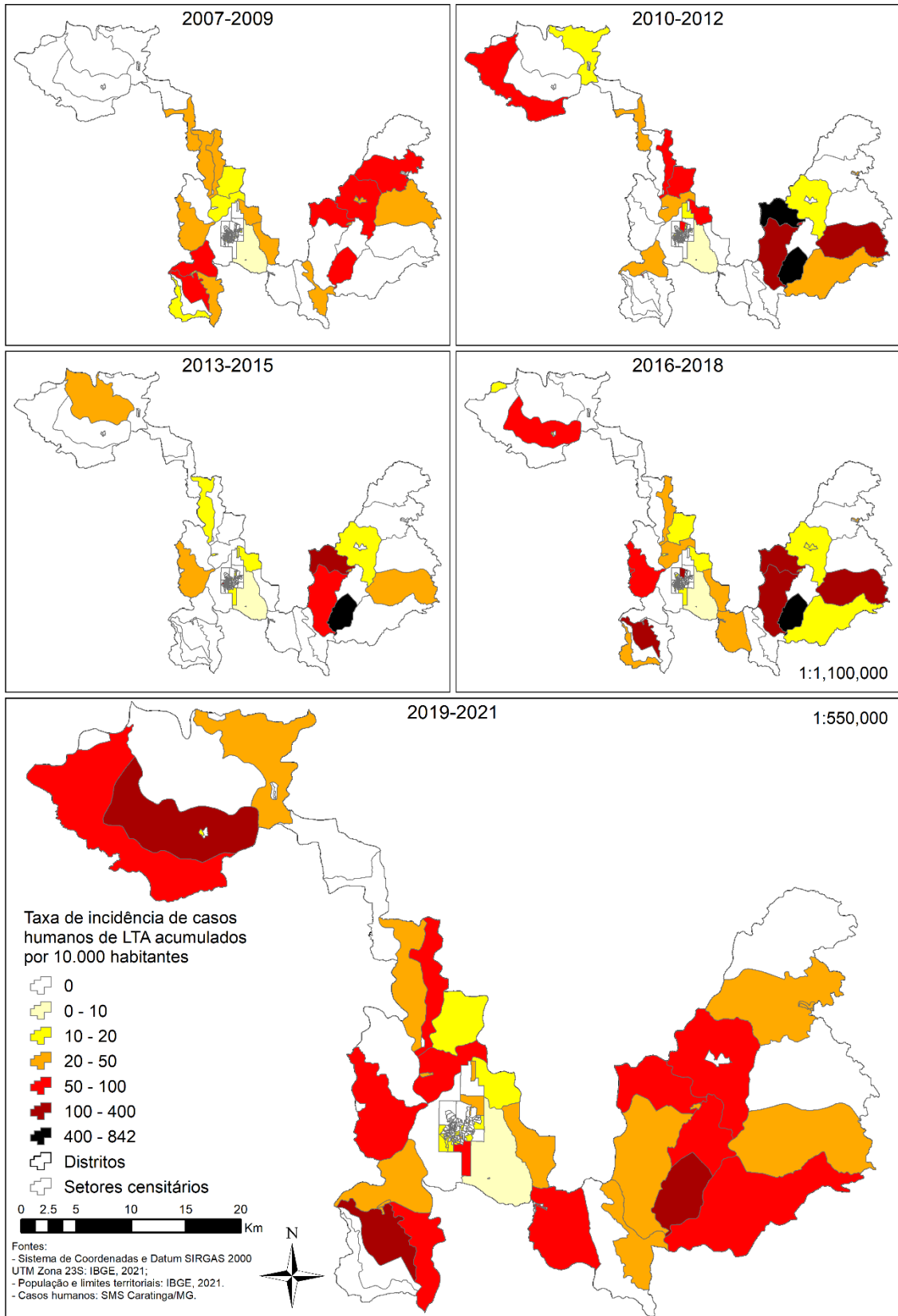


**Figura 3:** Número de triênios com casos de LTA no município de Caratinga (A) e na cidade de Caratinga (B).

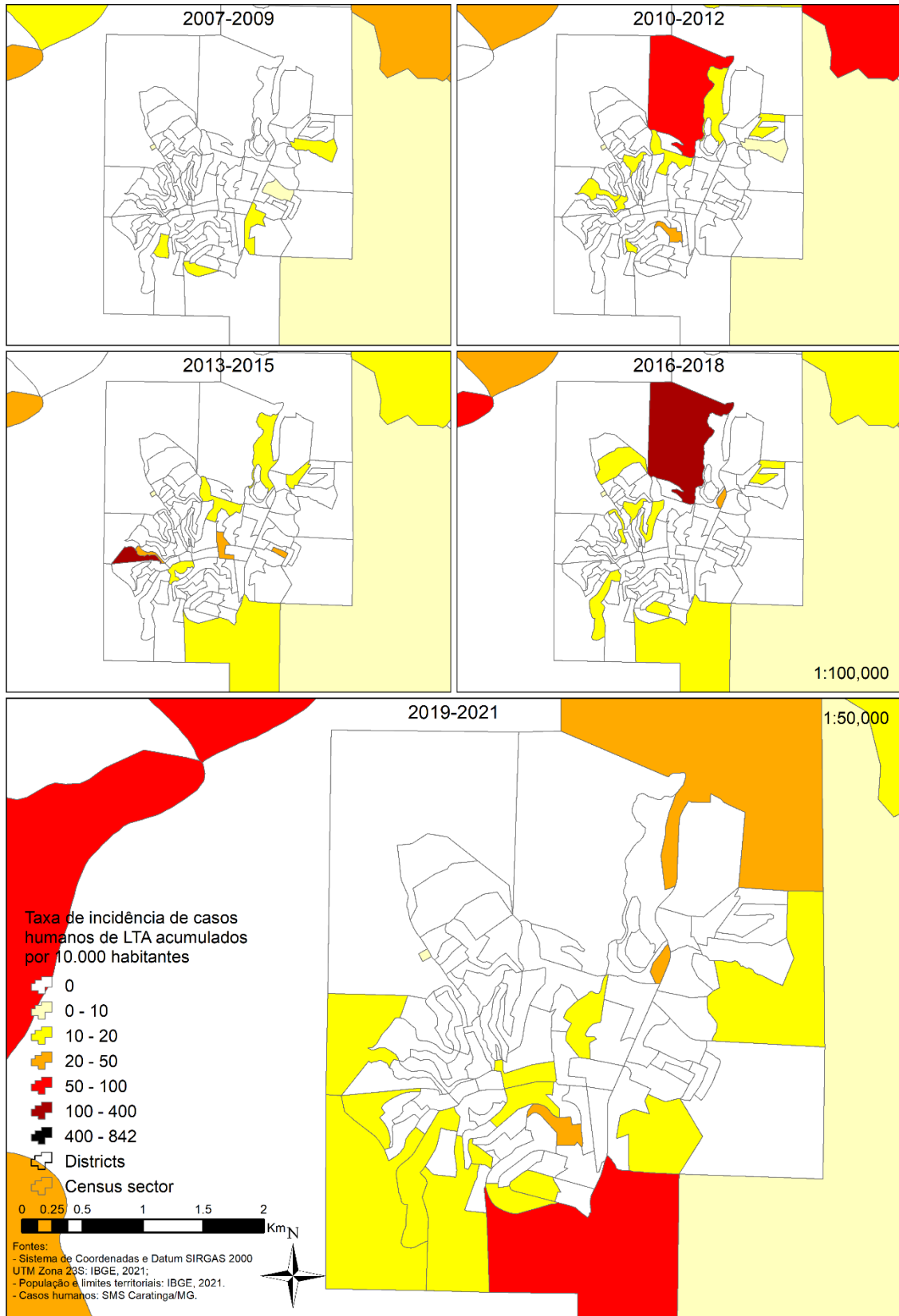
Em geral, a incidência acumulada foi menor no período 2013 – 2015 em comparação com os demais triênios (Figura 4A). Durante esse período, nenhuma predominância de altas taxas de incidência acumulada foi detectada em relação aos demais triênios. Em 2007 – 2009 os distritos de Cordeiro de Minas e São Cândido não apresentaram casos de LTA. Nos outros períodos, 2010 – 2012, 2016 – 2018 e 2019 – 2021 a incidência aumentou acima de 100/10.000, incluindo a área urbana de Caratinga (região sudoeste) (Figura 4B), e as áreas rurais de Patrocínio de Caratinga, Santo Antônio do Manhuaçu e Sapucaia (Figura 4A).

Durante o período de 2019 – 2021 foram detectadas taxas de incidência de 255,1/10.000 habitantes, com casos em todos os distritos em comparação com os períodos anteriores. Todos os setores censitários dos distritos de Dom Modesto e Patrocínio de Caratinga registraram casos. O triênio 2019 – 2021 apresentou o maior número de setores censitários com casos nas áreas rural e urbana (Figuras 4A e B) em comparação com os demais períodos da série histórica. Diante dos dados apresentados, partimos então para as análises de elipses.





**Figura 4A:** Incidência acumulada dos casos de LTA registrados no município de Caratinga por triênio, entre os anos de 2007 a 2021.

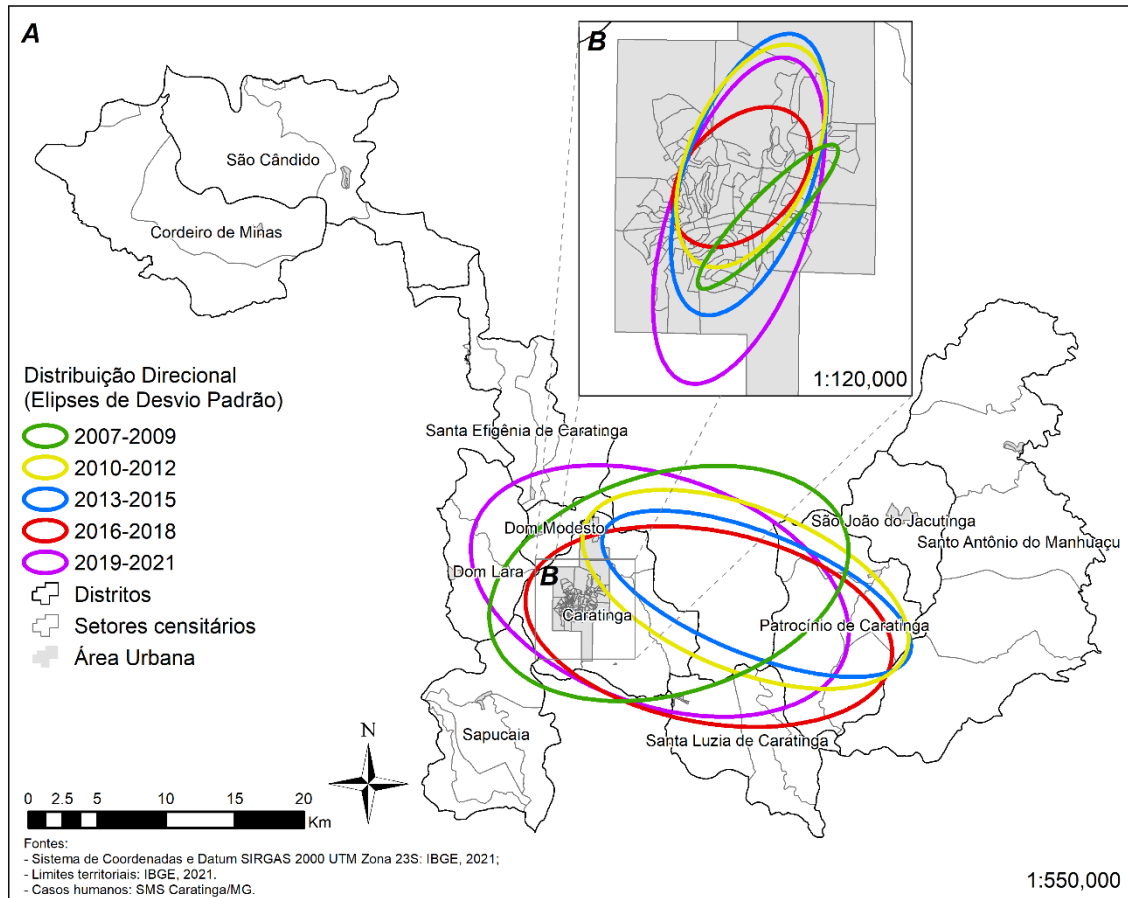


**Figura 4B:** Incidência acumulada dos casos de LTA registrados na área urbana de Caratinga por triênio, entre os anos de 2007 a 2021.

## 6.2 Análise espacial

As Elipses de Distribuição Direcionais apresentaram certa mobilidade. A elipse no primeiro período (2007 – 2009) teve uma localização mais periférica em relação as outras elipses. Nos próximos triênios as elipses englobaram uma parte mais central da região (Figura 5A). Embora houvesse um pequeno número de casos no triênio 2013 – 2015, o perfil da elipse foi muito similar ao triênio 2010 – 2012 confirmando o direcionamento das mesmas para a região central. Finalmente, no último triênio (2019 – 2021), houve um aumento de sua área de abrangência, com distribuição mais ampla de casos de LTA em todas as direções e um ligeiro deslocamento para o norte, provavelmente devido ao aumento do número de casos que se intensificou.

Na área urbana (Figura 5B) observa-se que no período 2010 – 2015 houve um leve aumento na amplitude das elipses seguido de uma diminuição em 2016 – 2018. A elipse correspondente ao triênio de 2019 – 2021 abrangeu parte do eixo norte/sul da cidade de Caratinga.



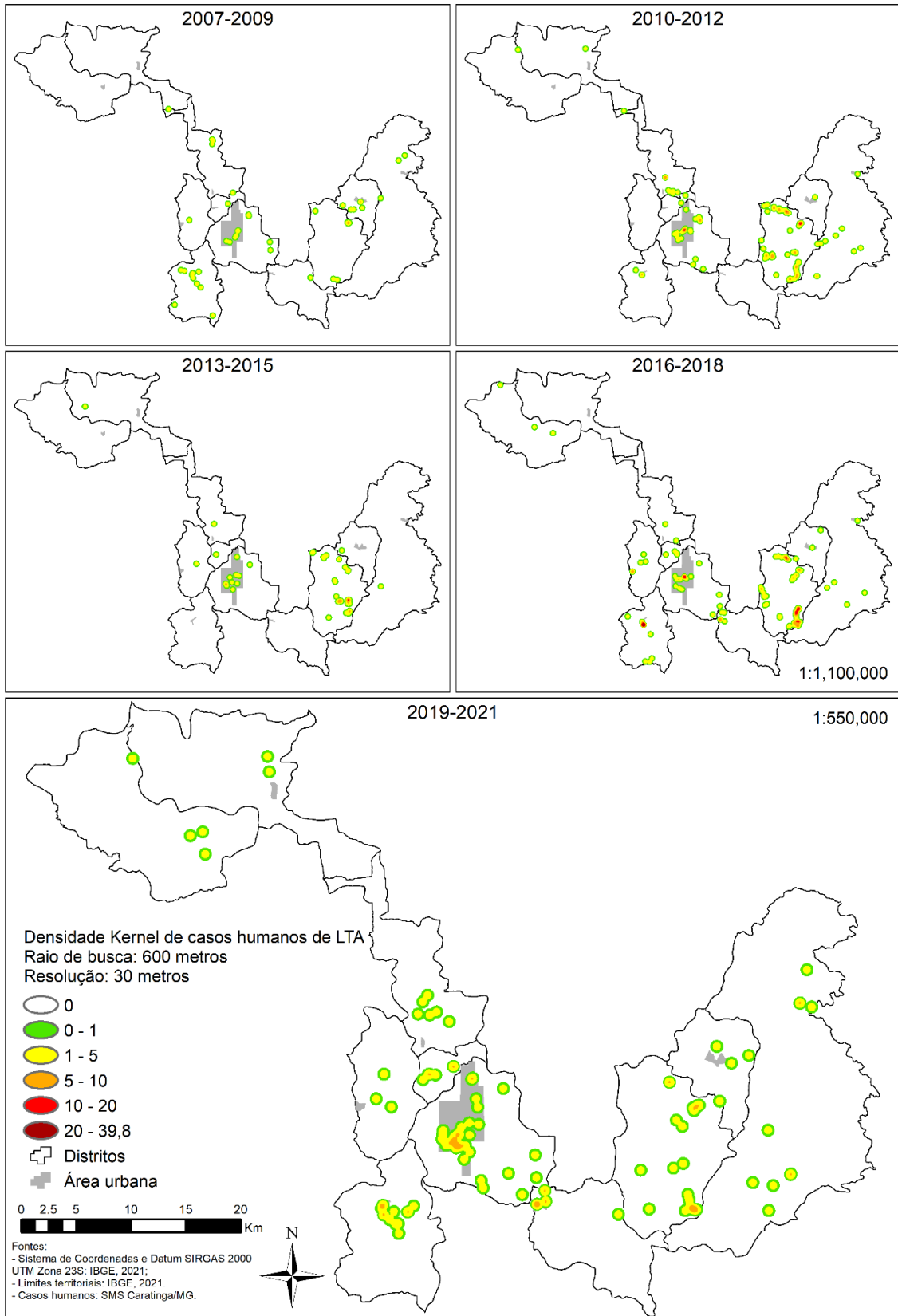
**Figura 5:** Elipses de distribuição dos casos de LTA no município de Caratinga (A) e na área urbana de Caratinga (B), por triênio, durante o período de 2007 a 2021.

Complementando as informações contidas nas elipses, a Tabela 6 mostra a área acometida pela doença em cada triênio. Sobrepondo os cinco triênios, observa-se uma área total de cobertura de 171 km<sup>2</sup> evidenciando uma expansão territorial da doença.

**Tabela 6:** Área afetada, por triênio, no município de Caratinga.

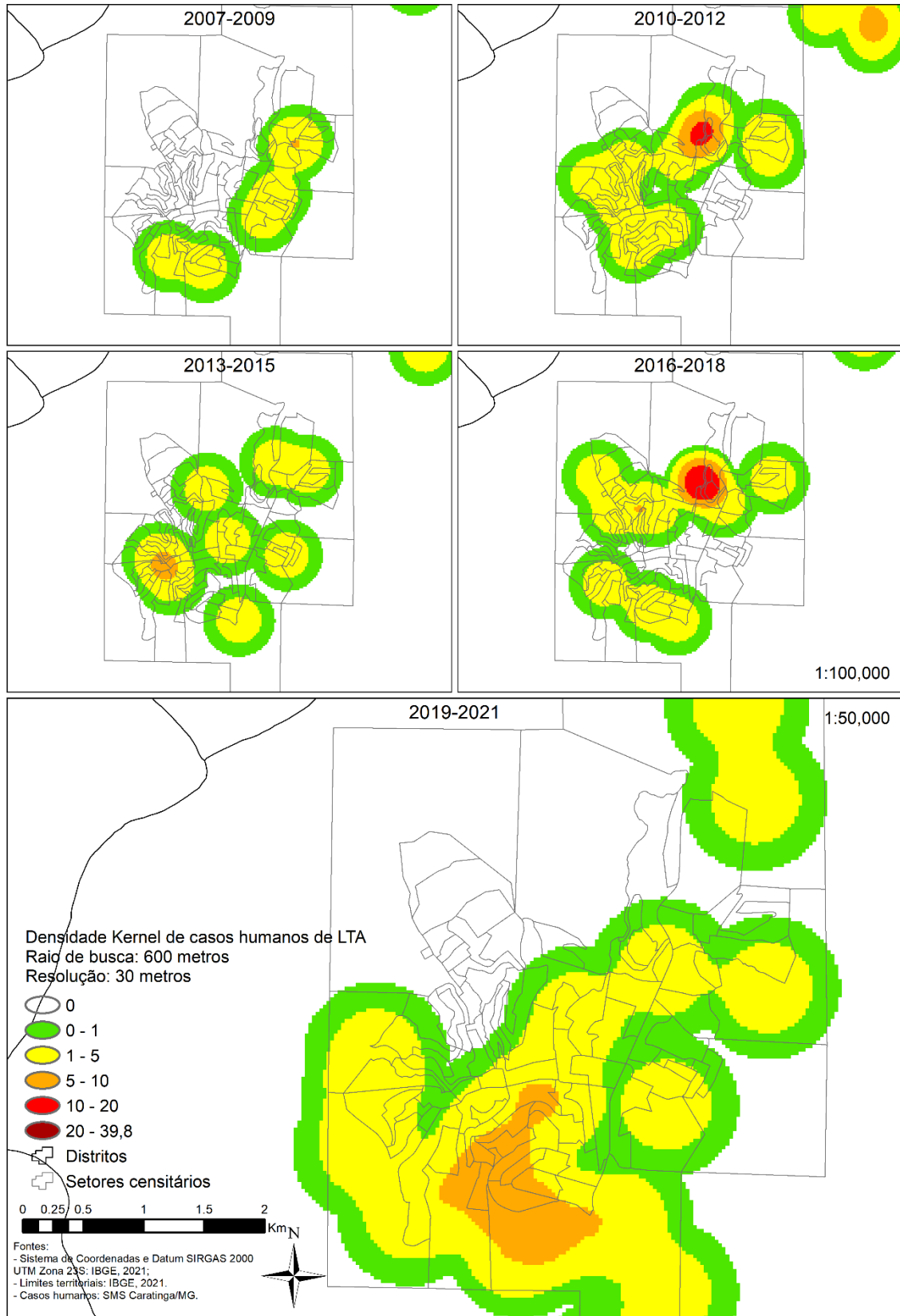
Triênio	Área afetada (km <sup>2</sup> )	Aumento (km <sup>2</sup> )	Área afetada acumulada (km <sup>2</sup> )
2007-2009	39		39
2010-2012	66	+56	95
2013-2015	34	+15	110
2016-2018	68	+29	139
2019-2021	82	+32	171

Confirmando as observações das análises anteriores, a Densidade de Kernel detectou vários *hotspots*, incluindo o distrito de Patrocínio de Caratinga e a área urbana de Caratinga (todos os triênios), e o distrito de Sapucaia (2007 – 2009, 2010 – 2012, 2016 – 2018 e 2019 – 2021) (Figura 6A).



**Figura 6A:** Densidade de Kernel dos casos de LTA no município de Caratinga por triênio, entre os anos de 2007 a 2021.

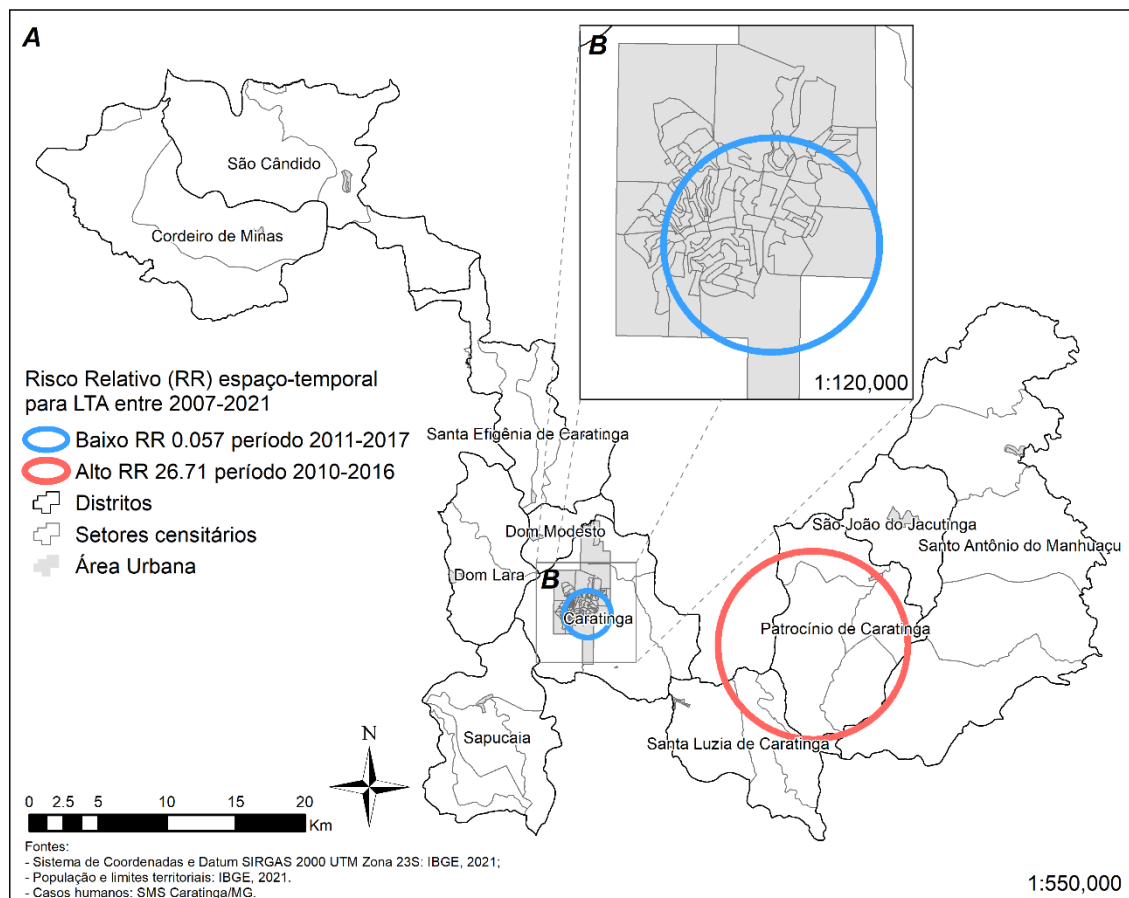
Foi feita a Densidade de Kernel para a cidade de Caratinga conforme apresentado na Figura 6B. Embora alguns casos tenham sido observados no triênio 2007-2009, a partir de 2010 observa-se um aumento considerável da área de abrangência de casos como também da densidade sendo identificados *hotspots* nas regiões central e sudoeste da cidade.



**Figura 6B:** Densidade de Kernel dos casos de LTA na área urbana de Caratinga por triênio, entre os anos de 2007 a 2021.



Para refinar as análises foi determinado o Risco Relativo (RR) durante todo o período do estudo. Esta análise foi feita considerando o município de Caratinga. Por se tratar de uma análise espacial, o RR associou o número de casos total e o espaço. Esta análise identificou uma área com alto e outra com baixo risco de transmissão de LTA. O alto risco abrangeu a área rural, do distrito de Patrocínio de Caratinga, este RR foi de 26,71 no período de 2010 a 2016 (Figura 7A). O baixo risco pertence a parte urbana de Caratinga, com um RR de 0,057 no período de 2011 a 2017 (Figura 7B).



**Figura 7:** Risco Relativo dos casos de LTA registrados no distrito de Patrocínio de Caratinga (A) e na área urbana de Caratinga (B).

### 6.3 Estudo dos flebotomíneos

Ao longo dos anos de 2020 e 2021 foram coletados 13.043 espécimes de flebotomíneos pertencentes a sete gêneros e 11 espécies, sendo 7.547 fêmeas (57,86%) e 5.496 machos (42,14%). Do total de flebotomos coletados, 5.235 (40,14%) são da espécie *Nyssomyia whitmani*, 3.948 (30,27%) *Nyssomyia intermedia*, 3.078 (23,60%) *Migonemyia migonei*, 238

(1,82%) *Evandromyia lenti*, 218 (1,67%) *Pintomyia pessoai*, 153 (1,17%) *Micropygomyia quinquefer*, 108 (0,83%) *Nyssomyia neivai*, 57 (0,44%) *Evandromyia cortelezzii*, 3 (0,02%) *Brumptomyia cunhai*, 3 (0,02%) *Sciopemyia microps* e 2 (aproximadamente 0,02%) *Micropygomyia capixaba* (Tabela 7). O acesso aos locais escolhidos para realizar as coletas foi concedido verbalmente pelos proprietários e/ou responsáveis pelo local.

**Tabela 7:** Número de flebotomíneos coletados por ano e local de coleta no município de Caratinga entre 2020 e 2021.

Espécies	2020			2021			Total			Total (%)
	Patrocínio de Caratinga			Cidade de Caratinga Sapucaia						
	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
<i>Brumptomyia cunhai</i>	3	0	3	0	0	0	3	0	3	0,02
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	0	0	0	20	37	57	20	37	57	0,44
<i>Evandromyia lenti</i>	100	138	238	0	0	0	100	138	238	1,82
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	11	142	153	0	0	0	11	142	153	1,17
<i>Micropygomyia capixaba</i>	2	0	2	0	0	0	2	0	2	0,02
<i>Migonemyia migonei</i>	1.372	1.591	2.963	51	64	115	1.423	1.655	3.078	23,60
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1.515	2.335	3.850	44	54	98	1.559	2.389	3.948	30,27
<i>Nyssomyia neivai</i>	40	68	108	0	0	0	40	68	108	0,83
<i>Nyssomyia whitmani</i>	2.097	2.827	4.924	143	168	311	2.240	2.995	5.235	40,14
<i>Pintomyia pessoai</i>	98	120	218	0	0	0	98	120	218	1,67
<i>Sciopemyia microps</i>	0	3	3	0	0	0	0	3	3	0,02
Total (%)	5.238	7.224	12.462	258	323	581	5.496	7.547	13.043	100
	42,03	57,97	100	44,41	55,59	100	42,14	57,86		

No Córrego Volta Grande (Figuras 8 e 9), foram coletados, no ano de 2020, 12.462 espécimes sendo 7.224 fêmeas e 5.238 machos pertencentes a sete gêneros e 10 espécies com predominância das espécies *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia*, e *Mg. migonei*. Os pontos 16, 3, 13 e 12 foram os pontos com maior número de flebotomíneos coletados (1.810, 1.646, 1.426 e 1.000 respectivamente) (Tabela 8).

**Tabela 8:** Flebotomíneos capturados e separados por sexo e pontos de coleta na localidade do Córrego Volta Grande, região de Patrocínio de Caratinga em 2020.

Espécies	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7		P8		P9		P10	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<i>Brumptomyia cunhai</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
<i>Evandromyia lenti</i>	0	0	5	0	0	41	13	4	0	0	0	0	10	0	3	1	0	0	5	54
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0	0	4	5	0	56	0	28	0	0	0	5	0	11	0	14	0	7	0	6
<i>Micropygomyia capixaba</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Migonemyia migonei</i>	0	2	19	4	56	65	19	48	14	14	40	26	28	10	11	7	43	31	192	125
<i>Nyssomyia intermedia</i>	19	50	72	115	170	196	36	146	7	2	10	14	21	29	11	9	25	83	41	199
<i>Nyssomyia neivai</i>	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Nyssomyia whitmani</i>	22	43	128	141	642	391	75	299	28	4	29	61	24	57	27	39	90	152	55	296
<i>Pintomyia pessoai</i>	11	2	3	0	9	15	4	0	4	0	4	0	6	0	0	0	0	0	1	12
<i>Sciopemyia microps</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Total	52	97	231	265	882	764	147	525	53	20	83	106	89	107	53	70	163	276	294	692
	149		496		1.646		672		73		190		196		123		439		986	

Continuação...

Espécies	P11		P12		P13		P14		P15		P16		P17		P18		P19		P20		Total	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<i>Brumptomyia cunhai</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
<i>Evandromyia lenti</i>	20	13	13	8	0	3	2	0	5	0	6	0	6	0	8	1	2	13	2	0	100	138
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0	0	2	4	0	3	5	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	142
<i>Micropygomyia capixaba</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Migonemyia migonei</i>	140	170	49	169	199	299	37	183	31	19	414	374	32	19	25	5	19	20	4	1	1.372	1.591
<i>Nyssomyia intermedia</i>	159	166	83	222	252	310	33	93	16	33	275	159	121	238	27	19	36	39	101	213	1.515	2.335
<i>Nyssomyia neivai</i>	10	12	0	0	0	0	16	33	0	0	4	20	4	3	0	0	0	0	0	0	40	68
<i>Nyssomyia whitmani</i>	167	102	78	361	142	213	79	82	17	51	291	177	107	220	42	16	30	38	24	84	2.097	2.827
<i>Pintomyia pessoai</i>	0	5	3	8	5	0	10	10	0	0	35	55	3	13	0	0	0	0	0	0	98	120
<i>Sciopemyia microps</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Total	496	468	228	772	598	828	182	401	69	106	1025	785	273	493	102	41	87	110	131	298	5.238	7.224
	964		1.000		1.426		583		175		1.810		766		143		197		429		12.462	



**Figuras 8 e 9:** Armadilhas luminosas instaladas no Córrego Volta Grande, região de Patrocínio de Caratinga em 2020.

Em 2021, a coleta entomológica foi realizada na cidade de Caratinga e no distrito de Sapucaia. Para melhor visualização das informações, os dados obtidos nas capturas nestas duas áreas foram apresentados em tabelas distintas. Em Caratinga (Figuras 10 e 11), foram capturados 149 espécimes, sendo 66 machos e 83 fêmeas, de duas espécies, pertencentes ao mesmo gênero *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*. Com exceção do centro da cidade de Caratinga (U5), em todas as demais áreas foram capturados flebotomíneos (Tabela 9).

**Tabela 9:** Flebotomíneos capturados e separados por sexo e local de coleta na área urbana de Caratinga em 2021.

Espécies	Anápolis		Anápolis		Esplanada		Esplanada		Centro		Limoeiro		Total	
	U1		U2		U3		U4		U5		U6			
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<i>Nyssomyia intermedia</i>	0	0	8	12	0	0	0	0	0	0	0	0	8	12
<i>Nyssomyia whitmani</i>	11	14	24	25	13	14	5	10	0	0	5	8	58	71
<b>Total</b>	11	14	32	37	13	14	5	10	0	0	5	8	66	83
	25		69		27		15		0		13		149	



**Figura 10:** Centro da cidade de Caratinga visto do bairro Anápolis, Caratinga, 2021.



**Figura 11:** Armadilha luminosa instalada no bairro Limoeiro, cidade de Caratinga.

No distrito de Sapucaia (Figuras 12 e 13) foram coletados 432 espécimes pertencentes a três gêneros e quatro espécies *Ev. cortelezzii*, *Mg. migonei*, *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*. Em todos os pontos estas espécies foram coletadas. Destaque para os pontos T8 e T7 onde o número de espécimes foi maior (121 e 119 respectivamente) (Tabela 10).

**Tabela 10:** Flebotomíneos capturados e separados por sexo e local de coleta no distrito de Sapucaia em 2021.

Espécies	Área de transição, distrito de Sapucaia								Total	
	T7		T8		T9		10		♂	♀
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	5	12	5	15	5	5	5	5	20	37
<i>Migonemyia migonei</i>	12	19	11	22	13	12	15	11	51	64
<i>Nyssomyia intermedia</i>	8	13	7	14	12	8	9	7	36	42
<i>Nyssomyia whitmani</i>	24	26	23	24	18	24	20	23	85	97
Total	49	70	46	75	48	49	49	46	192	240
	119		121		97		95		432	



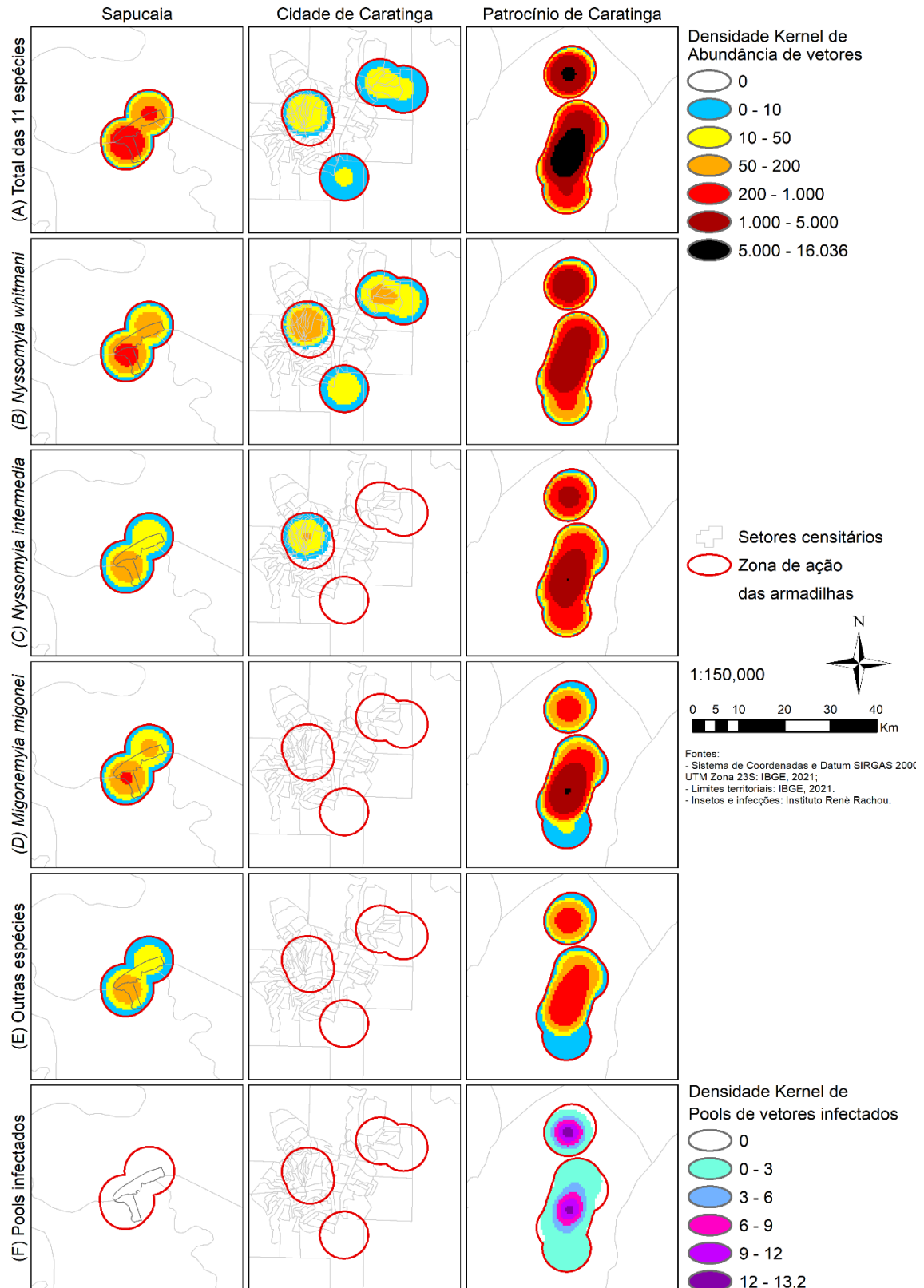
**Figura 12:** Vista geral da praça central do distrito de Sapucaia, 2021.



**Figura 13:** Vista geral da área residencial do distrito de Sapucaia, 2021.

A Figura 14A mostra a densidade total de flebotomíneos coletados ao longo do período nas áreas estudadas. Como mostrado, a espécie *Ny. whitmani* (Figura 14B), *Ny. intermedia* (Figura 14C) e *Mg. migonei* (Figura 14D) foram mais abundantes do que outras espécies coletadas (Figura 14E). Conforme observado, a densidade de flebotomíneos foi maior em Patrocínio de Caratinga e menor em Caratinga.





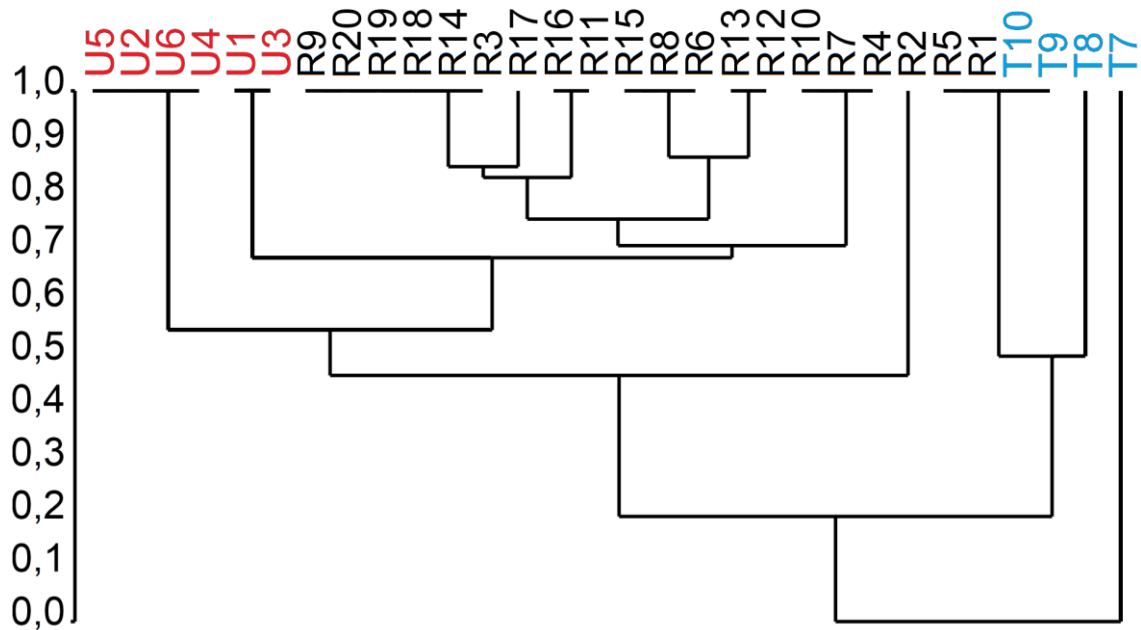
**Figura 14:** Densidade de flebotomíneos coletados na área urbana de Caratinga (zona urbana, U1 – U6) e nos distritos de Sapucaia (zona de transição, T7 – T10) e Patrocínio de Caratinga (zona rural, R1 – R20) no período de 2020 a 2021. Em (A) o total de flebotomíneos coletados, (B) o total da espécie *Ny. whitmani*, (C) o total da espécie *Ny. intermedia*, (D) o total da espécie *Mg. migonei*, (E) o total das outras espécies de flebotomíneos coletadas e (F) o total de pools contendo flebotomíneos infectados.

A avaliação da diversidade (H) e similaridade da fauna flebotomínica apresentada na Tabela 11 mostra que uma baixa diversidade de espécies foi encontrada na área urbana de Caratinga, como mostrado pelo alto índice de dominância (D), enquanto os índices de Simpson (1-D) e Shannon (H) foram muito baixos. Em cada ponto de coleta realizado no município de Caratinga, a riqueza (S) variou de 2 a 10 espécies, sendo os maiores índices de Shannon e Simpson de 1,318 e 0,702 respectivamente. Na área urbana de Caratinga, os índices de diversidade H e 1-D foram menores do que nas outras localidades. Conforme observado, os distritos de Sapucaia e Patrocínio de Caratinga apresentaram maior riqueza (S) e abundância (N), já a dominância (D) nestas mesmas localidades foi baixa. Os índices de diversidade foram muito semelhantes entre as áreas, e maiores do que no município de Caratinga, mas ainda considerados baixos para o esforço amostral, corroborados pelos índices de Margalef. A equitabilidade (J) foi alta em Sapucaia, e mediana na cidade de Caratinga e no distrito de Patrocínio em Caratinga, indicando leve predominância de algumas espécies.

**Tabela 11:** Análise da diversidade e similaridade da fauna flebotomínica nas áreas de coleta no município de Caratinga.

Índices	Caratinga (área urbana)	Sapucaia	Patrocínio de Caratinga	Total
Riqueza (S)	2	4	10	11
Abundância (N)	149	432	12462	13043
Dominância (D)	0.768	0.298	0.309	0.309
Simpson (1-D)	0.232	0.702	0.691	0.691
Shannon (H)	0.394	1.293	1.318	1.331
Margalef	0.199	0.494	0.954	1.055
Equitabilidade (J)	0.569	0.933	0.572	0.555

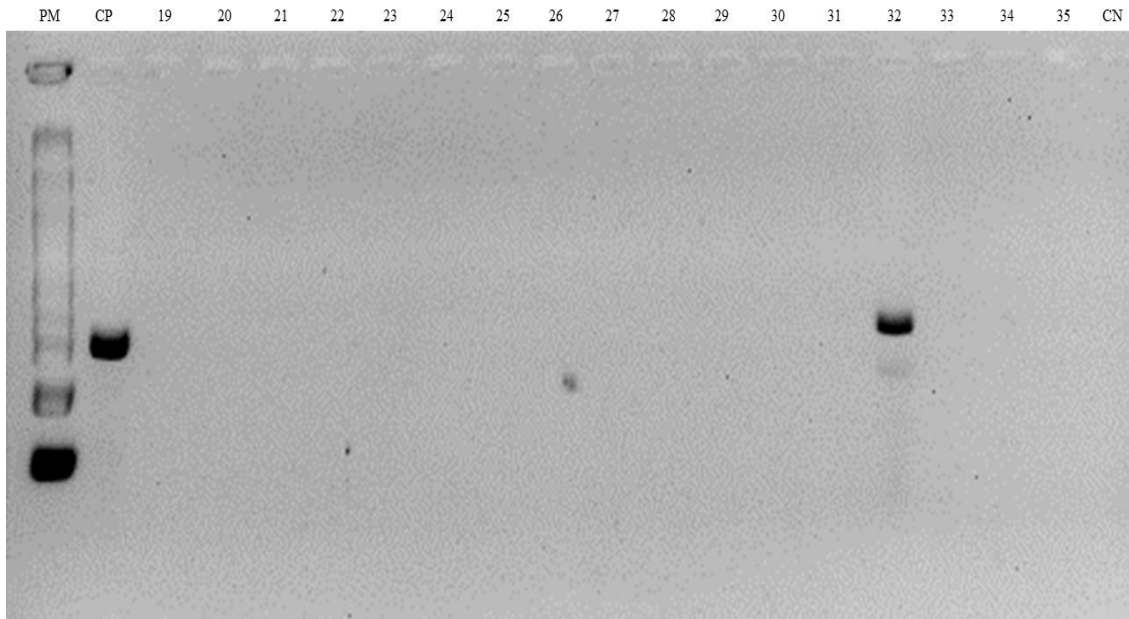
O Índice Jaccard apresentou baixa similaridade entre as áreas avaliadas, sendo 40% entre todo município e o distrito de Sapucaia, e 30% entre Sapucaia e Patrocínio de Caratinga e apenas 20% entre todo o município e Patrocínio de Caratinga. O agrupamento hierárquico apresentado na Figura 15 mostrou estreita relação entre as áreas de cada distrito, apontando para agrupamentos e arranjos distintos de comunidades de espécies vetoras em cada ambiente. Esta análise também evidenciou a presença de três aglomerados, sendo um na área urbana de Caratinga, zona urbana (vermelho), outro no distrito de Sapucaia, zona de transição (azul), e o último na zona rural de Patrocínio de Caratinga (preto).



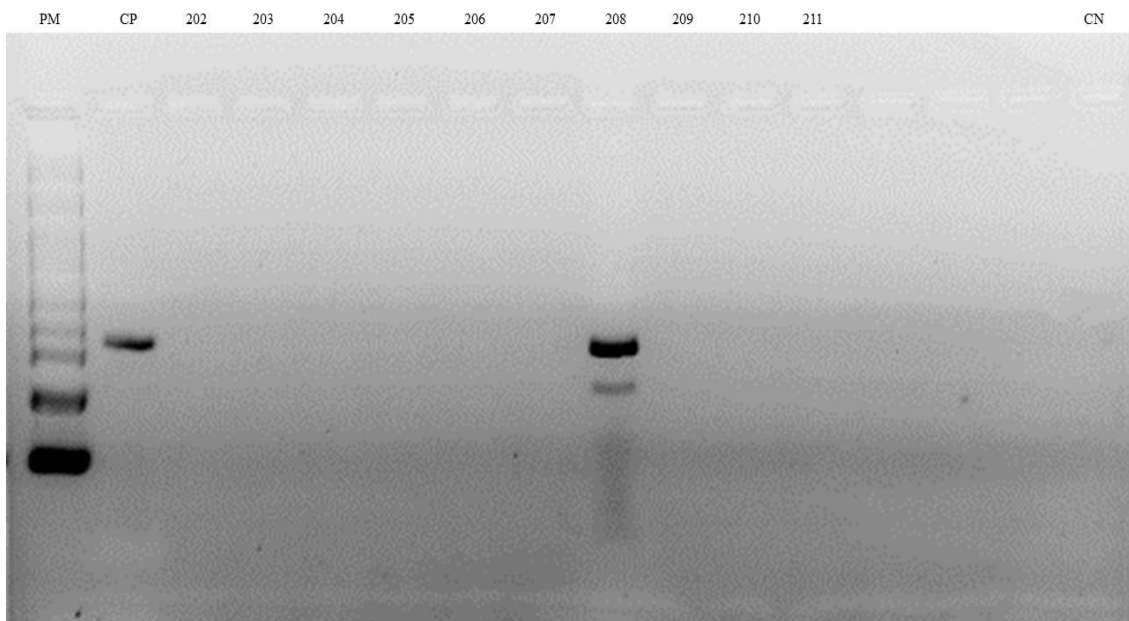
**Figura 15:** Agrupamento hierárquico apresentando a similaridade entre as áreas de coleta entomológica. Em vermelho os locais de coleta na zona urbana (U1 – U6), cidade de Caratinga; em preto, a zona rural (R1 – R20), Córrego Volta Grande, distrito de Patrocínio de Caratinga; e em azul, zona de transição (T7 – T10), distrito de Sapucaia.

#### 6.4 Estudos moleculares

Para a pesquisa do DNA de *Leishmania*, as fêmeas de flebotomíneos foram agrupadas em "pools" contendo no máximo dez espécimes da mesma espécie, localidade e data de coleta. Do total de 7.547 fêmeas foram obtidos 1.054 pools, sendo 936 na coleta realizada no ano de 2020 e 118 no ano de 2021. A coleta entomológica de 2020, no Córrego Volta Grande apresentou 13 pools (~1,23%) positivos para *Leishmania braziliensis* pela técnica de PCR dirigida ao *ITS I* (Figuras 16 e 17). Deste total, as espécies positivas foram, *Ny. whitmani* (7), *Ny. intermedia* (4) e *Mg. migonei* (2). Pools positivos foram detectados nos pontos P3 (5), P4 (1), P10 (2), P12 (1), P13 (2), P16 (1) e P20 (1). Nenhum dos 118 pools das amostras entomológicas de 2021, coletados na cidade de Caratinga e na zona de transição do distrito de Sapucaia foi positivo. Nem todas as áreas com alta densidade de flebotomíneos apresentaram alta densidade de infecção conforme apresentado na Figura 14F.

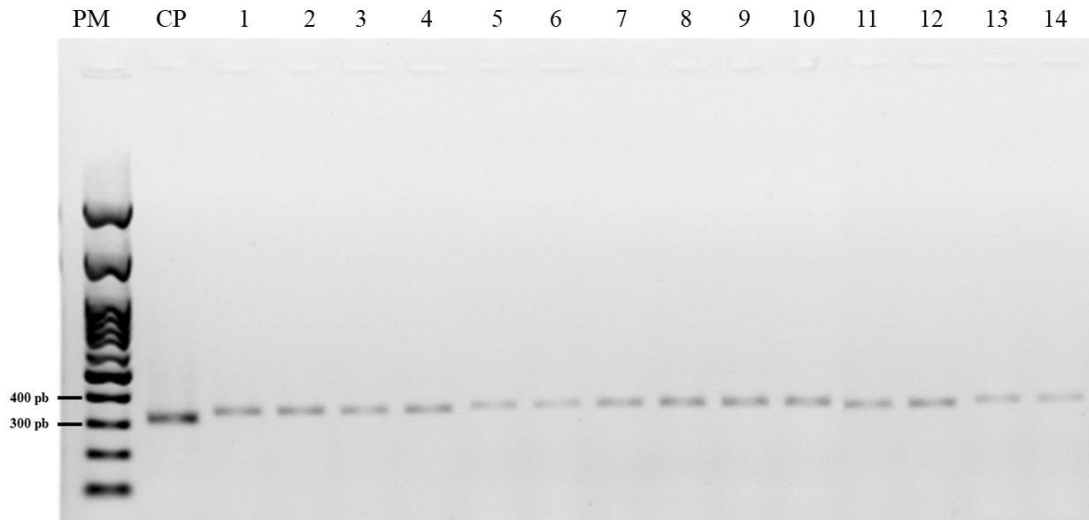


**Figura 16:** Gel de agarose apresentando a detecção de DNA de *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos utilizando a região intergênica *ITS 1*. Legenda: PM: peso molecular (100 pb); CP: controle positivo (*Leishmania braziliensis*); 19 a 35: *pools* da coleta entomológica realizada em janeiro de 2020 no Córrego Volta Grande, região do distrito de Patrocínio de Caratinga e CN: controle negativo (machos da espécie *Nyssomyia whitmani*).



**Figura 17:** Gel de agarose apresentando a detecção de DNA de *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos utilizando a região intergênica *ITS 1*. Legenda: PM: peso molecular (100 pb); CP: controle positivo (*Leishmania braziliensis*); 202 a 211: *pools* da coleta entomológica, realizada em janeiro de 2020 no Córrego Volta Grande, região do distrito de Patrocínio de Caratinga e CN: controle negativo (machos da espécie *Nyssomyia whitmani*).

Durante o período de 2020 – 2021 foram realizadas 27 biópsias humanas no Serviço de Saúde de Caratinga. Desse total, 19 homens (~70%) e 8 mulheres (~30%) residentes, segundo os registros fornecidos, tanto na zona rural quanto na zona urbana do município. Em todas as amostras foi identificada a espécie *Leishmania braziliensis* pela técnica de PCR dirigida ao ITS 1 (Figura 18).



**Figura 18:** Gel de agarose apresentando a detecção de DNA de *Leishmania* em amostras humanas, obtidas no Serviço de Saúde de Caratinga. Legenda: PM: peso molecular (100 pb); CP: controle positivo (*Leishmania braziliensis*); 1 a 14: amostras provenientes de biópsias humanas.

Ao longo da pesquisa entomológica, 40 das 7.547 fêmeas apresentavam sangue na cavidade intestinal. Os 383pb do gene CytB foram amplificados nestas amostras, pertencentes as espécies *Ny. whitmani* (15), *Ny. intermedia* (14), *Mg. migonei* (10) e *Ev. lenti* (1). Todas essas fêmeas alimentadas foram coletadas em Patrocínio de Caratinga. As análises por sequenciamento identificaram cinco espécies de vertebrados nas amostras (Tabela 12). O *Homo sapiens* foi a fonte de sangue mais comum em 16 das 40 amostras analisadas. Ressalto que apenas *Ny. whitmani* apresentou a maior diversidade de fontes alimentares, realizando o repasto sanguíneo em todas as cinco espécies de vertebrados identificadas (*Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Sus scrofa*, *Bos taurus* e *Capra hircus*).

**Tabela 12:** Fontes de repasto sanguíneo identificadas em fêmeas de flebotomíneos coletadas no município de Caratinga no período de 2020 e 2021.

Espécies	Fonte alimentar	Score total	Query cover (%)	Valor-e	Identidade (%)
<i>Evandromyia lenti</i>	<i>Homo sapiens</i>	468	100	2e-127	94.16
<i>Migonemyia migonei</i>	<i>Homo sapiens</i>	431	100	6e-116	90.85
	<i>Homo sapiens</i>	573	100	8e-159	99.69
	<i>Homo sapiens</i>	466	100	7e-127	95.93
	<i>Homo sapiens</i>	383	100	8e-102	87.94
	<i>Homo sapiens</i>	500	97	4e-137	94.44
	<i>Homo sapiens</i>	567	98	3e-157	99.38
	<i>Gallus gallus</i>	513	97	7e-141	95.18
	<i>Gallus gallus</i>	512	100	2e-140	96.55
	<i>Homo sapiens</i>	573	100	8e-159	99.69
	<i>Gallus gallus</i>	532	100	2e-146	99.66
<i>Nyssomyia intermedia</i>	<i>Homo sapiens</i>	555	100	3e-153	99.36
	<i>Homo sapiens</i>	645	94	6e-156	100.00
	<i>Homo sapiens</i>	570	100	1e-157	99.69
	<i>Sus scrofa</i>	950	100	2e-158	98.49
	<i>Sus scrofa</i>	896	100	4e-154	99.06
	<i>Bos taurus</i>	572	97	3e-158	98.79
	<i>Sus scrofa</i>	833	96	9e-155	99.37
	<i>Homo sapiens</i>	444	100	3e-120	91.46
	<i>Homo sapiens</i>	571	98	3e-158	99.38
	<i>Sus scrofa</i>	778	100	8e-156	99.37
	<i>Gallus gallus</i>	567	96	3e-157	100.00
	<i>Sus scrofa</i>	535	100	2e-147	98.38
	<i>Sus scrofa</i>	575	96	2e-159	99.69
	<i>Sus scrofa</i>	349	100	1e-91	90.64
	<i>Nyssomyia whitmani</i>	<i>Sus scrofa</i>	851	100	3e-155
<i>Gallus gallus</i>		562	97	1e-155	99.38
<i>Gallus gallus</i>		428	96	2e-115	89.57
<i>Gallus gallus</i>		524	96	4e-144	96.85
<i>Gallus gallus</i>		535	95	2e-147	97.77
<i>Homo sapiens</i>		536	95	6e-148	99.35
<i>Homo sapiens</i>		542	98	1e-149	98.72
<i>Sus scrofa</i>		852	98	8e-150	98.14
<i>Sus scrofa</i>		872	100	2e-137	95.56
<i>Bos taurus</i>		527	95	3e-145	96.88
<i>Capra hircus</i>		687	98	8e-160	99.69
<i>Sus scrofa</i>		824	90	4e-154	99.07
<i>Gallus gallus</i>		478	100	1e-129	96.31
<i>Gallus gallus</i>		559	100	3e-154	99.07
<i>Homo sapiens</i>		581	97	2e-161	100.00

## 7 DISCUSSÃO

O município de Caratinga está incluído em uma das mesorregiões mais afetadas pela LTA no estado de Minas Gerais (Cardoso *et al.*, 2019) sendo também uma área onde há vários anos são relatados casos da doença. No entanto, há duas décadas, desde o início dos anos 2000, não são realizados estudos ecoepidemiológicos sobre a LTA em Caratinga.

Estudos anteriores realizados nos estados brasileiros do Paraná (Melo, Rossoni, Teodoro, 2017), São Paulo (Fonseca *et al.*, 2014), Amazonas (Oliart-Guzmán *et al.*, 2013) e Minas Gerais (Pinto *et al.*, 2020) mostraram que demograficamente a LTA é uma doença predominantemente rural que afeta homens e indivíduos com baixa escolaridade, perfil este, confirmado neste estudo. Os resultados apresentados aqui, juntamente com os de Melo *et al.*, (2017), mostraram que a forma cutânea é a mais prevalente (~98%) e o tratamento medicamentoso a principal medida profilática de controle.

Foi detectada uma alta frequência de casos urbanos, e duas questões podem ser consideradas nesse cenário: 1) esses pacientes residem na área urbana e frequentemente se deslocam para as áreas rurais do entorno, e 2) a transmissão também pode estar ocorrendo na área urbana. Este segundo ponto foi comprovado em nosso primeiro artigo que mostrou a transmissão da infecção na área urbana da cidade (Neves *et al.*, 2021). Neste estudo foi realizada uma análise espacial de uma série histórica (2007 – 2018) e foram coletados flebotomíneos em áreas da cidade, impactadas pela doença. Em conclusão, os casos de LTA são cada vez mais notificados não só na zona rural, mas também na área urbana do município de Caratinga.

As baixas taxas de incidência observadas entre o triênio de 2013 – 2015 podem ser resultado de vários fatores derivados da notificação, incluindo a subnotificação. Este é um problema constante não apenas no Brasil, mas também em vários outros lugares endêmicos, incluindo Argentina e Colômbia (Seneviratue, Gunatilake, Silva, 1997; WHO, 2010; Yadón *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2002; Desjeux, 2004; Alvar *et al.*, 2012). Observa-se, após 2015, um aumento na incidência de LTA, provavelmente devido à melhora do diagnóstico, aumento da transmissão da doença ou ambos os fatores. Isso também confirma achados anteriores em outras regiões endêmicas brasileiras (Brito, Dias, Sousa, 2019; Dentoni *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020) e pode ser justificado por ações antrópicas, variações ambientais, pressão socioeconômica e urbanização desordenada.

Durante todo o período analisado, não houve homogeneidade nas taxas de incidência, havendo uma oscilação no número de casos de LTA. Embora tenham sido observados picos de casos da doença nos triênios de 2010 – 2012 e 2016 – 2018, nota-se que nos anos de 2019 e 2020 o número de casos continuou alto, com queda em 2021. A manutenção do elevado número de casos de LTA nos últimos três anos pode ser decorrente do aumento da transmissão. Porém, ressalto que a partir de 2019, o serviço de referência em Leishmaniose na cidade de Caratinga foi reestruturado com o apoio de nossa equipe. Esse fato pode ter contribuído para o aumento dos casos notificados da doença devido à melhoria do diagnóstico e acompanhamento contínuo dos pacientes mesmo durante a pandemia de COVID – 19.

Os distritos de Patrocínio de Caratinga e Sapucaia registraram a maioria dos casos entre 2007 – 2018. No último triênio, 2019 – 2021, além dos distritos citados acima, Santa Luzia de Caratinga também registrou elevado número de casos de LTA. Foi detectada alta frequência de casos urbanos nos últimos três anos quando comparado ao período de 2007 – 2018 (Tabela 5). O aumento de casos na área urbana, bem como a expansão da área de ocorrência da doença, pode ser decorrente de diversos fatores, como deslocamento de populações rurais para áreas urbanas e vice-versa, fluxos migratórios dos reservatórios do parasito e adaptação de espécies vetoras para ambientes modificados. Esta última pode ser justificada uma vez que as espécies transmissoras foram coletadas na área urbana. Esses dados reforçam que Sapucaia e Patrocínio de Caratinga devem passar por uma vigilância epidemiológica mais rigorosa, pois nos distritos rurais esse aumento pode estar relacionado à expansão agrícola e à proximidade com flebotomíneos (Margonari *et al.*, 2012; Teixeira-Neto *et al.*, 2014; Menezes *et al.*, 2015).

A análise espacial fornece informações valiosas para a tomada de decisões e desenvolvimento de políticas de saúde e prevenção de doenças (Ayubi *et al.*, 2018; Firouraghi *et al.*, 2022). As limitações deste trabalho, no que diz respeito aos métodos de análise espacial, são o tamanho e o formato do município de Caratinga (Figura 1C) e a distância de alguns distritos em relação à cidade de Caratinga, o que leva alguns pacientes a buscar atendimento em cidades próximas, limitando ou dificultando o serviço de notificação e vigilância epidemiológica.

Os mapas de incidência acumulada (Figuras 4A e B) mostram que a área urbana de Caratinga e a zona rural de Patrocínio de Caratinga e Sapucaia foram regiões mais acometidas pela LTA durante a série histórica (Neves *et al.*, 2021). Observa-se que a evolução da incidência ao longo dos anos pode ser explicada por mudanças na dinâmica de transmissão da infecção (Chaves *et al.*, 2008; Karagiannis-Voules *et al.*, 2013). No período de 2019 – 2021, os casos de LTA notificados no município de Caratinga apresentaram distribuição homogênea, o que justifica o perfil de distribuição apresentado principalmente na Figura 4A. Portanto, vemos claramente que o município de Caratinga possui, além de Patrocínio e Sapucaia, outras áreas onde se justificam medidas de prevenção e controle da doença.

A técnica de Elipse de Distribuição Direcional foi realizada com o objetivo de confirmar o padrão de distribuição dos casos de LTA. Essa técnica ajudou a minimizar a falta e/ou as informações imprecisas das fichas de notificação que podem surgir, visto que, em vários locais o Serviço de Vigilância Epidemiológica é precário ou inexistente (Duncan, White, Mergersen, 2017; Cruz *et al.*, 2022). As elipses nos primeiros quatro triênios, de 2007 – 2018, não mudaram muito, já a elipse do último triênio, 2019 – 2021, (Figura 5A) compreendeu uma área maior.



Apesar das elipses não abrangerem todos os distritos de Caratinga, elas incluíram comunidades rurais que poderiam ser consideradas regiões prioritárias para o controle da doença no município. Na área urbana de Caratinga (Figura 5B) as elipses mostraram que a maior densidade populacional e a presença de vetores podem favorecer a transmissão e/ou risco de contrair a doença.

É importante notar que a área urbana de Caratinga apresentou vários *hotspots* em todo o período analisado. No Brasil, a urbanização da leishmaniose visceral, é frequentemente relatada (França-Silva *et al.*, 2003; Barbora *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2018), onde grandes cidades se tornaram áreas endêmicas para *Leishmania infantum*. Em Caratinga há registros desta doença (Souza *et al.*, 2013). Embora no município, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN, 2023) tenham sido notificados quatro casos de LV entre 2007 – 2021, o baixo número de casos requer atenção da Vigilância Epidemiológica uma vez que o município tem um número considerável de cães soltos e abandonados e possivelmente o inquérito sorológico nestes animais e também nos domiciliados não é realizado.

Como mencionamos, a presença constante de casos urbanos de LTA em Caratinga merece mais atenção das autoridades públicas. Os moradores podem ter adquirido a doença não só na área rural, mas também na área urbana. O *hotspot* localizado na zona norte da cidade é bastante urbanizado e próximo a uma pedreira. Já o *hotspot* localizado na Região Sudoeste é uma área principalmente residencial.

Após análise de risco relativo (RR), observa-se que o município de Caratinga e o distrito de Patrocínio de Caratinga representam áreas de baixa e alta transmissão de LTA, respectivamente. Isso reforça a necessidade de priorizar as medidas de vigilância e controle da doença nessas localidades, principalmente onde se concentra o maior risco (Silva *et al.*, 1999; Silva, Muniz, 2009; Andrade, Santana, Sacramento, 2014; Buzanovsky *et al.*, 2020).

Os últimos artigos científicos publicados sobre a fauna de flebotomíneos no município de Caratinga datam da década de 1970 (Dias *et al.*, 1977; Mayrink *et al.*, 1979a). Nesses estudos, foram realizadas coletas entomológicas em outras áreas, como o distrito de São João do Jacutinga, Córrego das Palmeiras e Barracão, esta última área não mais pertencente ao município. Aqui, identificamos a fauna de flebotomíneos no Córrego Volta Grande, zona rural de Patrocínio de Caratinga e na área urbana da cidade de Caratinga e distrito de Sapucaia. Todas as áreas de coleta estão localizadas nos domínios da Mata Atlântica. Com exceção do centro de Caratinga (U5), todos os pontos possuem fatores que favorecem a presença de flebotomíneos. No Córrego Volta Grande, as áreas de coleta apresentam características rurais com áreas de

mata, pecuária e lavouras. No distrito de Sapucaia e no município de Caratinga, os pontos de coleta estão situados na periferia urbana e urbana, respectivamente com a presença de animais domésticos. A perda de diversidade da fauna nos ambientes modificados pode levar ao aumento da infecção em animais domésticos e humanos como consequência da diminuição do efeito diluidor (Gil *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2021). Embora estas áreas sejam diferentes, todas merecem vigilância epidemiológica ostensiva pelas autoridades de saúde locais.

A diversidade de espécies de flebotomíneos coletadas, com maior abundância na área rural de Patrocínio de Caratinga, mostra a adaptação desses insetos a diferentes níveis de ação antrópica (Tonelli *et al.*, 2021). Nas áreas avaliadas, os casos de LTA e os impactos ambientais têm sido historicamente relacionados a processos de ocupação humana a exemplo do desmatamento, da perda da biodiversidade e da adaptação das espécies vetoras a ambientes antrópicos. Nos ambientes urbanos, a presença de vegetação serve como ambiente para reprodução e descanso (Neves *et al.*, 2021). As espécies de flebotomíneos encontradas confirmam a capacidade desses insetos de se adaptarem a diversos ambientes diferentes de seus habitats naturais (Barata *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2015). A densidade de vetores está relacionada a aspectos ambientais favoráveis a proliferação destes insetos no ambiente peridoméstico, como presença de vegetação, raízes, árvores troncos e matéria orgânica, que são possíveis abrigos e criadouros do vetor (Miranda *et al.*, 2002).

Considerando que a área urbana de Caratinga apresenta não apenas taxas variáveis de casos de LTA, mas também uma área de transição entre áreas urbanas e rurais, a diversidade de flebotomíneos observada neste trabalho corrobora não apenas com estudos realizados no passado (Dias *et al.*, 1977; Mayrink *et al.*, 1979a), mas também com estudos atuais realizados em diversas áreas do estado de Minas Gerais (Rêgo *et al.*, 2014; Sanguinette *et al.*, 2015).

Conforme observado nos resultados da Tabela 7, as espécies *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia* e *Mg. migonei* foram as mais abundantes, o que é preocupante, indicando que nestas áreas podem ocorrer surtos de leishmaniose. Essas espécies, amplamente distribuídas pela América do Sul, podem tolerar e superar as mudanças ambientais, principalmente as que são provocadas pela ação antrópica, adaptando-se para sobreviver em novos nichos ecológicos (Peterson, Shaw, 2003; Ready, 2008). O grande número de espécimes coletados pode estar relacionado ao fato de que as capturas foram feitas no peridomicílio. A abundância dessas espécies nas áreas peridomiciliares pode indicar que a transmissão de *Leishmania braziliensis* ocorre neste ambiente e que os moradores têm o risco de adquirir a infecção independentemente da idade e do sexo. Vale ressaltar que *Mg. migonei* é um vetor permissivo, sendo capaz de se

infectar com várias espécies de *Leishmania* (Guimarães *et al.*, 2016). Neste estudo, não foi capturada a espécie *Lutzomyia longipalpis*, principal espécie vetora de *L. infantum* no Brasil.

Os valores de riqueza e diversidade encontrados (Tabela 11) mostram as diferenças em cada uma das três áreas de coleta (rural, transição e urbana). Essas diferenças possivelmente estão relacionadas aos diferentes níveis de conservação dos ecótopos estudados, o que pode afetar a disponibilidade de alimento e abrigo para flebotomíneos (Pinto *et al.*, 2010). Nesse sentido, pode-se observar que a riqueza de espécies de flebotomíneos é maior em áreas florestais do que em áreas menos arborizadas (Virgens *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2012). Este fato está de acordo com a maior riqueza de flebotomíneos observada na área rural de Patrocínio de Caratinga em relação ao ambiente urbano e ao distrito de Sapucaia.

É importante destacar que, embora os pontos de coleta no distrito de Sapucaia (T7 – T1) sejam na área urbana, esses locais ainda apresentam características rurais, sendo melhor classificados como área de transição. A presença de galinheiros e hortas próximos ao ambiente doméstico representa fator de risco para a proliferação e manutenção de espécies de flebotomíneos (Galati *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2012). Outro aspecto a destacar é que a diversidade (H) de insetos na área de transição é impactada pela localização desta área entre o ambiente de mata e o ambiente urbano. Este fato provavelmente levou a um maior número de insetos coletados em Sapucaia em comparação com a cidade de Caratinga.

A detecção e a identificação das espécies de flebotomíneos infectadas por parasitos do gênero *Leishmania* é essencial para determinar o risco de transmissão aos hospedeiros em uma determinada localidade. Tal fato possibilita um planejamento adequado das medidas de prevenção e controle das leishmanioses. Vários estudos epidemiológicos detectaram a presença de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Margonari *et al.*, 2010; Lara-Silva *et al.*, 2015; Lana *et al.*, 2015), onde os resultados desses estudos indicaram uma variação na frequência da contaminação entre ~0,5% (Pinto *et al.*, 2010) e ~39% (Ávila *et al.*, 2018). Os nossos resultados corroboram com alguns estudos apresentando ~1,23% de infecção pela espécie *L. braziliensis* no distrito de Patrocínio de Caratinga. Embora parasitos do gênero *Leishmania* não tenham sido detectados em amostras coletadas nas áreas urbanas de Caratinga e na área de transição do distrito de Sapucaia, a presença de espécies de flebotomíneos comprovadamente transmissoras de *Leishmania braziliensis* é um indicativo da possível transmissão desse parasito nessas localidades.

No Brasil, o exame parasitológico continua sendo um método de referência para o diagnóstico da LTA devido à sua especificidade. Todas as amostras humanas obtidas de casos suspeitos de LTA foram submetidas e confirmadas por técnica molecular. Em todas as amostras

foi detectada a espécie *L. braziliensis*. De acordo com os dados obtidos nos registros fornecidos pelo Serviço de Saúde, os casos de LTA são provenientes de locais onde a doença é comum. Os casos ocorridos em áreas rurais estão correlacionados com áreas de mata onde se mantém o ciclo do parasito, atividade econômica e lazer. A exposição do indivíduo ao ambiente natural é um fator importante para a manutenção da doença (Melchior, Brilhante, Chiaravalloti-Neto, 2017). A transmissão em áreas urbanas pode estar relacionada à urbanização de áreas rurais onde há ciclo do parasito, presença de vetores, animais reservatórios e variação no número de indivíduos suscetíveis (Machado-Coelho *et al.*, 1999).

A demonstração e a análise do sangue ingerido por diferentes espécies de flebotomíneos podem fornecer informações importantes para o estudo da infecção e transmissão de *Leishmania*. No presente estudo, tal análise foi capaz de identificar cinco espécies de mamíferos em 40 fêmeas de flebotomíneos analisadas. Como visto na Tabela 12, estes resultados mostraram a relação entre os vetores e alguns hospedeiros que podem atuar como fonte de infecção para o flebotomíneo, o que permite uma melhor compreensão dos diferentes componentes do ciclo de transmissão. Curiosamente, a espécie *Homo sapiens* foi a principal fonte de alimento detectada. Três outros vertebrados identificados são animais domésticos (galinha, boi e cabra) o que pode indicar que os flebotomíneos estão adaptados ao ambiente peridoméstico contribuindo assim para a transmissão nesse ambiente. A *Nyssomyia whitmani* foi a espécie que apresentou maior diversidade de fonte alimentar. Algumas espécies de vetores se alimentam exclusivamente em um vertebrado específico, enquanto outras se alimentam de múltiplos hospedeiros, incluindo aqueles conhecidos como reservatórios do protozoário (Meece *et al.*, 2005; Oshaghi *et al.*, 2006).

Não sabemos até que ponto a descontinuidade do Serviço de Referência pode ter impactado no aumento do número de casos nas últimas duas décadas. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que uma grande quantidade de fatores possa estar contribuindo para isso, incluindo mudanças ambientais, acesso a serviços de saúde e falta de conhecimento sobre a doença.

No entanto, este estudo demonstrou que é possível fornecer, retrospectivamente, um panorama dos padrões epidemiológicos do município de Caratinga a partir dos dados de notificação, enfatizando a importância da pesquisa passiva como ferramenta para a gestão do Programa de Controle da LTA. Com base no que foi apresentado, Caratinga ainda representa um local importante para a continuidade de estudos envolvendo a epidemiologia da doença. Tais estudos devem ser continuados, não só para a forma tegumentar, mas também para a forma visceral.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, foi possível, com o interesse da Prefeitura de Caratinga, a reestruturação do Serviço de Referência, permitindo assim a continuidade do serviço, melhoria na qualidade do atendimento e diagnóstico oferecido aos pacientes. Com isso, as equipes de saúde poderão ser mais atuantes no controle da LTA.

## 8 CONCLUSÕES

Entre o período de 2007-2021, os casos de LTA aumentaram não só na área urbana (Caratinga) como na área rural (distritos de Sapucaia e Patrocínio de Caratinga).

As análises demográficas indicam predominância dos casos de LTA cutâneos em indivíduos com baixa escolaridade e do sexo masculino;

Nas áreas mais afetadas pela LTA (Sapucaia e Patrocínio de Caratinga e a área urbana de Caratinga), os principais vetores capturados foram *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia* e *Mg. migonei*;

Cinco espécies de vertebrados serviram como recurso alimentar para estes insetos incluindo *Bos taurus*, *Capra hircus*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens* e *Sus scrofa*;

Em todas as amostras de DNA obtidas de flebotomíneos e pacientes a espécie *L. braziliensis* foi a única encontrada;

Os dados apresentados pelas análises espaciais e entomológicas confirmam a transmissão urbana da LTA em Caratinga.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrams, A. M; Kleinman, K. P. A SaTScan<sup>TM</sup> macro accessory for cartography (SMAC) package implemented with SAS<sup>®</sup> software. *International Journal of Health Geographics*, 6(1): 6, 2007.
- Akhoundi, M; Kuhls, K; Cannet, A; Votýpka, J; Marty, P; Delaunay, P; Sereno, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 0: e0004349, 2016.
- Alvar, J; Vélez, I. D; Bern, C; Herrero, M; Desjeux, P; Cano, J; Den Boer, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7(5): e35671, 2012.
- Alves, G. B; Oshiro, E. T; Leite, M. C; Melão, A. V; Ribeiro, L. M; Mateus, N. L. F; Brazil, R. P; Andrade-Filho, J. D; Oliveira, A. G. Phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Psychodidae) at rural settlements in the municipality of Cáceres, state of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45: 437 – 443, 2012.
- Andrade, I. M; Santana, G. M. S; Sacramento, R. V. O. Geoprocessing health: A study on American Tegumentary Leishmaniasis in Vale of Jiquiriçá, Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde – Hygeia*, 10(18): 1– 13, 2014.
- Antunes, C. M; Mayrink, W; Magalhaes, P. A; Costa, C. A; Melo, M. N; Dias, M; Michalick, M. S; Williams, P; Lima, A. O; Vieira, J. B. F; Schettini, A. P. M. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Epidemiology*, 15(4): 572 – 580, 1986.
- Ávila, M. M; Brilhante, A. F; Souza, C. F; Bevilacqua, P. D; Galati, E. A. B; Brazil, R. P. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American Tegumentary Leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. *Parasites & Vectors*, 11: 64, 2018.
- Ayubi, E; Barati, M; Dabbagh Moghaddam, A; Reza Khoshdel, A. Spatial modeling of cutaneous leishmaniasis in Iranian army units during 2014-2017 using a hierarchical Bayesian method and the spatial scan statistic. *Epidemiology and Health*, 40: e2018032, 2018.
- Bailey. T; Gatrell, A. *Interactive Spatial Data Analysis*. London: Longman Scientific and Technical, 1995.
- Banerjee, S. *Spatial Data Analysis*. *Annual Review of Public Health*, 37: 47 – 60, 2016.
- Barata, R. A; França-Silva, J. C; Mayrink, W; Silva, J. C; Prata, A; Lorosa, E. S; Fiúza, J. A; Gonçalves, C. M; Paula, K. M; Dias, E. S. Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 3: 421 – 425, 2005.
- Barbosa, D. S; Belo, V. S; Rangel, M. E; Werneck, G. L. Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. *Acta Tropica*, 131: 56 – 62, 2014.

Bates, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, New York, 37: 1097 – 1106, 2007.

Bates, P. A; Rogers, M. E. New insights into the development biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, Omaha, 4: 601 – 609, 2004.

Boakye, D. A; Tang, J; Truc, P; Merriweather, A; Unnasch, T. R. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Medical and Veterinary Entomology* 13: 282 – 287, 1999.

Brandão-Filho, S. P; Brito, M. E; Carvalho, F. G; Ishikaw, E. A; Cupolillo, E; Winter-Floeter, L; Shaw, J. J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*: 97: 291 – 296, 2003.

Brandão-Filho, S. P; Campbell-Lendrum, D; Brito, M. E. F; Shaw, J. J; Davies, C. R. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(5): 488 – 494, 1999.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

Brito, V. N; Dias, Á. F. L. R; Sousa, V. R. F. Epidemiological aspects of Leishmaniasis in the Pantanal region of Mato Grosso. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(4): 744 – 749, 2019.

Butenko, A; Kostygov, A. Y; Sádlová, J; Kleschenko, Y; Becvar, T; Podescová, L; Macedo, D. H; Zihala, D; Bates, P. A; Volf, P; Oppendoes, F. R; Yurchenko, V. Comparative genomics of *Leishmania (Mundinia)*. *BMC Genomics*, 20: 726, 2019.

Buzanovsky, L. P; Sanchez-Vazquez, M. J; Maia-Elkhoury, A. N. S; Werneck, G. L. Major environmental and socioeconomic determinants of cutaneous leishmaniasis in Brazil – a systematic literature review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53: e20190291, 2020.

Cárdenas, R; Sandoval, C. M; Rodriguez-Morales, A. J; Vivas, P. Zoonoses and climate variability: the example of leishmaniasis in southern departments of Colombia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149: 326 – 330, 2008.

Cardoso, D. T; Souza, D. C; Castro, V. N; Geiger, S. M; Barbosa, D. S. Identification of priority areas for surveillance of cutaneous leishmaniasis using spatial analysis approaches in Southeastern Brazil. *BMC Infectious Disease*, 19(1): 318, 2019.

Castro, L. S; Dorval, M. E. C; Matheus, L. M. D; Bednaski, A. V; Facco, G. G; Silveira, M; Santos, C. F; Gontijo, C. M. F; Oliveira, A. P. G; Ferreira, E. C. *Leishmania* presence in bats

in areas endemic for leishmaniasis in central-west Brazil. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 11: 261 - 267, 2020.

Chao, A; Chazdon, R. L; Colwell, R. K; Shen, T. J. A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology Letters*, 8: 148 - 159, 2005.

Chaves, L. F; Cohen, J. M; Pascual, M; Wilson, M. L. Social exclusion modifies climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. *PloS Neglected Tropical Disease*, 2: e176, 2008.

Confalonieri, U. E; Margonari, C; Quintão, A. F; Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Tropica*, 129: 33 – 41, 2013.

Cruz, C. D. S. S; Cardoso, D. T; Ferreira Júnior, C. L; Barbosa, D. S; Carneiro, M. Spatial and spatiotemporal patterns of human visceral leishmaniasis in an endemic southeastern area in countryside Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 55: e070220213, 2022.

Cupolillo, E; Medina-Acosta, E; Noyes, H; Momen, H; Grimaldi, G. Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*, 16: 142 – 144, 2000.

De Assis, R. R; Ibraim, I. C; Nogueira, P. M; Soares, R. P; Turco, S. J. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(9): 1354 - 1365, 2012.

Detoni, M. B; Lima, D. M; Silva, T. P; Machado, L. F; Tomiotto-Pellissier, F; Costa, I. N; Pavanelli, W. R; Oliveira, F. J. A; Custódio, L. A; Conchon-Costa, I; Melanda, F. N. Temporal and spatial distribution of American Tegumentary Leishmaniasis in north Paraná: 2010 – 2015, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52: e20180119, 2019.

Dey, R; Joshi, A. B; Oliveira, F; Pereira, L; Guimarães-Costa, A. B; Serafim, T. D; de Castro, W; Coutinho-Abreu, I. V; Bhattacharya, P; Townsend, S; Aslan, H; Perkins, A; Karmakar, S; Ismail, N; Karetnick, M; Meneses, C; Duncan, R; Nakhasi, H. L; Valenzuela, J. G; Kamhawi, S. Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammation-Derived IL-1 $\beta$ . *Cell Host and Microbe*, 23(1): 134 - 143, 2018.

Dias, M; Mayrink, W; Deane, L. M; Costa, C. A; Magalhães, P. A; Melo, M. N; Batista, S. M; Araújo, F. G; Coelho, M. V; Williams, P. Epidemiology of mucocutaneous leishmaniasis Americana. I. Study of reservoirs in an endemic region of the State of Minas Gerais. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 19(6): 403 - 410, 1977.

Dostálová, A; Volf, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, London, 1: 276 - 287, 2012.

Duncan, E. W; White, N. M; Mengersen, K. Spatial smoothing in Bayesian models: a comparison of weights matrix specifications and their impact on inference. *International Journal of Health Geographics*, 16: 47, 2017.



Duncan, M; Deane, J; White, P. D; Ridge, D; Roylance, R; Korszun, A; Chalder, T; Bhui, K. S; Thaha, M. A; Bourke, L. A survey to determine usual care after cancer treatment within the United Kingdom National Health Service. *BMC Câncer*, 17(1): 186, 2017.

El Tai, N. O; Osman, O. F; 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 (sscp) and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94, 1 – 5, 2000.

Espinosa, O. A; Serrano, M. G; Camargo, E. P; Teixeira, M. M. G; Shaw, J. J. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, 145(4): 430 – 442, 2016.

Ferreira, E. C; Cruz, I; Cañavate, C; Melo, L, A; Pereira, A. A. S; Madeira, F. A. M; Valério, S. A. N; Cunha, H, M; Paglia, A. P; Gontijo, C. M. F. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. *BMC Veterinary Research*, 11(71): 1 - 7, 2015.

Ferreira, F. F; Duca de Freitas, M. B; Szinwelski, N; Vicente, N; Medeiros, L. C. C; Schaefer, C. E. G. R; Dergam, J. A; Sperber, C. F. Impacts of the Samarco tailing dam collapse on metals and arsenic concentration in freshwater fish muscle from Doce River, southeastern Brazil. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10.1002/ieam.4289, 2020.

Firouraghi, N; Mohammadi, A; Hamer, D. H; Bergquist, R; Mostafavi, S. M; Shamsoddini, A; Raouf-Rahmati, A; Fakhar, M; Moghaddas, E; Kiani, B. Spatio-temporal visualisation of cutaneous leishmaniasis in an endemic, urban area in Iran. *Acta Tropica*, 225: 106181, 2022.

Fonseca, E. S; D'Andrea, L. A; Taniguchi, H. H; Hiramoto, R. M; Tolezano, J. E; Guimarães, R. B. Spatial epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in a municipality of west São Paulo State, Brazil. *Journal of Vector Borne Diseases*, 51(4): 271 - 275, 2014.

França-Silva, J. C; Costa, R. T; Siqueira, A. M; Machado-Coelho, G. L. L; Costa, C. A; Mayrink W, Vieira, E. P; Costa, J. S; Genaro, O; Nascimento, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 111(2 – 3): 161–173, 2003.

Freitas, T.P.T. A Ecoepidemiologia das Leishmanioses: levantamento de flebotomíneos em Cuiabá e investigação quanto a participação de roedores e marsupiais em Rondonópolis, Mato Grosso. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2010.

Galati, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E. R; Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, 23 – 52, 2003.

Galati, E. A. B; Nunes, V. L. B; Cristaldo, G; Rocha, H. C. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 32: 235 – 261, 2003.

Gil, J. F; Nasser, J. R; Cajal, S. P; Juarez, M; Acosta, N; Cimino, R. O; Diosque, P; Krolewiecki, A. J. Urban transmission of American cutaneous leishmaniasis in Argentina: spatial analysis study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(3): 433 – 440, 2010.

Gonçalves, A. F. L. S; Lima, S. S; Silva, A. P. S. C; Barbosa, C. C. Spatial dynamics and socioeconomic factors correlated with American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil from 2008 to 2017. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53: e20190373, 2020.

Gonçalves, N. V; Miranda, C. S. C; Costa, R. J. F; Guedes, J. A; Matsumura, E. S. S; Costa, S. B. N; Noguchi, S. K. T; Guimarães, L. H. R; Oliveira, R. A. C; Tavares, L. S. A; Palácios, V. R. C. M; Xavier, M. B. Cutaneous leishmaniasis: Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará, Brazilian Eastern Amazon. *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(10): 939 - 944, 2019.

Gontijo, C. M. F; Silva, E. S; Fuccio, M. B; Sousa, M. C. A; Pacheco, R. S; Dias, E. S; Filho, J. D. A; Brazil, R. P; Melo, M. N. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica*, 81(2): 143 – 150, 2002.

Guerra, J. A. O; Guerra, M. G. V. B; Vasconcelos, Z. S; Freitas, N. S; Fonseca, F. R; Silva Júnior, R. C. A; Silva, A. S; Sampaio, V; Maciel, M. G; Cavalcante, M. S. M; Albuquerque, B. C; Santos, G. M; Garnelo. Socioenvironmental aspects of the Purus Region - Brazilian Amazon: Why relate them to the occurrence of American Tegumentary Leishmaniasis? *PLoS One*, 14(2): e0211785, 2019.

Guerra, J. A. O; Talhari, S; Gomes Paes, M; Garrido, M; Talhari, J. M. Aspectos clínicos e diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar Americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 587 – 590, 2003.

Guimarães, A. C; Nogueira, P. M; Silva, S. O; Sadlova, J; Pruzinova, K; Hlavacova, J; Melo, M. N; Soares, R. P. Lower galactosylation levels of the Lipophosphoglycan from *Leishmania (Leishmania) major*-like strains affect interaction with *Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(5): e170333, 2018.

Guimarães, V. C. F. V; Pruzinova, K; Sadlova, J; Volfova, V; Myskova, J; Brandão Filho, S. P; Volf, P. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*, 17(9): 159, 2016.

Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, 354(9185): 1191 – 1199, 1999.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021. Disponível em: <https://censo2010.ibge.gov.br/>. Acessado em 23 dezembro 2022.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010. Disponível em: <https://censo2010.ibge.gov.br/>. Acessado em 29 de março de 2020.

Ives, A; Hornet, C; Prevel, F; Ruzzant, G; Fuertes-Marraco, S; Schutz, F; Zangger, H; Revaz-Breton, M; Lye, L; Hickerson, S. M; Beverley, S. M; Acha-Orbea, H; Launois, P; Fasel, N;

Masina, S. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*, 331(6018): 775 – 778, 2011.

Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, Oxford, 22(9): 439 – 445, 2006.

Kamhawi, S; Ramalho-Ortigao, M; Van, M. P; Kumar, S; Lawyer, P. G; Turco, S. J; Barillas-Mury, C; Sacks, D. L; Valenzuela, J. G. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119(3): 329 – 341, 2004.

Karagiannis-Voules, D. A; Scholte, R. G. C; Guimarães, L. H; Utzinger, J; Vounatsou, P. Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 7: e2213, 2013.

Kaye, P; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8): 604 – 615, 2011.

Kulldorff, M. SaTScan - Software for the spatial, temporal, and spacetime scan statistics. Boston, 2016.

Lainson, R; Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. *In*: Peters W; Killick-Kendrick, R. *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Vol. 1. Biology and Epidemiology. London: Academic, 1 – 120 pp, 1987.

Lainson, R; Shaw, J. J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64: 3 – 9, 1989.

Lainson, R; Shaw, J. J. Leishmanias and leishmaniasis for the New World, with particular reference to Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 7: 1 – 19, 1973.

Lana, R. S; Michalsky, E. M; Fortes-Dias, C. L; França-Silva, J. C; Lara-Silva, F. O; Lima, A. C. V. M. R; Avelar, D. M; Martins, J. C. D; Dias, E. S. Phlebotomine sand fly fauna and leishmania infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a natural Brazilian heritage site. *BioMed Research International*, 2015: 385493, 2015.

Langeron, M. Précis de microscopie. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Médecine, Saint-Germain, Paris, 1, 1949.

Lara-Silva, F. O; Michalsky, E. M; Fortes-Dias, C. L; Fiuza, V. O. P; Pessanha, J. E. M; Regina-Silva, S; Avelar, D. M; Silva, M. A; Lima, A. C. V. M. R; Costa, A. J. A; Machado-Coelho, G. L. L; Dias, E. S. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Tropica*, 148: 128 – 136, 2015.

Lima, B. S; Dantas-Torres, F; Carvalho, M. R; Marinho-Junior, J. F; Almeida, E. L; Brito, M. E. F; Francisco, G; Brandão-Filho, S. P. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107: 592 – 597, 2013.

- Machado-Coelho, G. L; Assunção, R; Mayrink, W; Caiaffa, W. T. American cutaneous leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering. *International Journal of Epidemiology*, 28(5): 982 – 989, 1999.
- Magalhães, P. A; Mayrink, W; Costa, C. A; Melo, M. N; Dias, M; Batista, S. M; Michalick, M. S. M; Williams, P. Calazar na zona do Rio Doce-Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 22(4): 197 – 202, 1980.
- Maia-Elkhoury, A. N; Yadón, Z. E; Díaz, M. I. S; Lucena, F. F. A; Castellanos, L. G; Vazquez, M. J. S. Exploring Spatial and Temporal Distribution of Cutaneous Leishmaniasis in the Americas, 2001-2011. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 10(11): e0005086, 2016.
- Marcelino, A. P; Ferreira, E. C; Avendanha, J. S; Costa, C. F; Chiarelli, D; Almeida, G; Moreira, E. C; Leite, R. C; Reis, J. K. P; Gontijo, C. M. F. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 183(1 – 2): 54 – 58, 2011.
- Marchi, M. N. A; Caldart, E. T; Martins, F. D. C; Freire, R. L. Spatial analysis of leishmaniasis in Brazil: a systematized review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 61: e68, 2019.
- Marcondes, C. B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological News*, 118: 351 – 356, 2007.
- Margonari, C; Menezes, J. A; Rocha, M. N; Maia, K. N; Oliveira, M. E; Fonseca, A. L; Sousa, F. F; Ferreira, E. C; Madureira, A. P; Melo, M. N; Soares, R. P. Public Knowledge about and Detection of Canine Visceral Leishmaniasis in Urban Divinópolis, Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, 429586, 2012.
- Margonari, C; Soares, R. P; Andrade Filho, J. D; Xavier, D. C; Saraiva, L; Fonseca, A. L; Silva, R. A; Oliveira, M. E; Borges, E. C; Borges, C. C; Melo, M. N. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 47(6): 1212 – 1219, 2010.
- Marinho-Júnior, J. F. Infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil. 2010. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.
- Maroli, M; Feliciangeli, M. D; Bichaud, L; Charrel, R. N; Gradoni, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*. 27: 123 – 147, 2012.
- Mayrink, W; Costa, C. A; Magalhães, P. A; Melo, M. N; Dias, M; Lima, A. O; Michalick, M. S; Williams, P. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(4): 385 – 387, 1979b.

Mayrink, W; Magalhães, P. A; Dias, M; Costa, C. A; Melo, M. N; Lima, A. O. Responses to Montenegro antigen after immunization with killed *Leishmania* promastigotes. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1978; 72(6): 676, 1978.

Mayrink, W; Melo, M. N; Costa, C. A; Magalhães, P. A; Dias, M; Coelho, M. V; Araújo, F. G; Williams, P; Figueiredo, U. P; Batista, S. M. Intradermorreação de Montenegro na leishmaniose tegumentar americana após terapêutica antimonial. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 18: 182 – 185, 1976.

Mayrink, W; Mendonça-Mendes, A; Paula, J. C; Siqueira, L. M. V; Marrocos, S. R; Dias, E. S; Andrade, H. M; Machado-Coelho, G. L. L; Cluster randomised trial to evaluate the effectiveness of a vaccine against cutaneous leishmaniasis in the Caratinga microregion, south-east Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 107(4): 212 – 219, 2013.

Mayrink, W; Williams, P; Coelho, M. V; Dias, M; Martins, A. V; Magalhães, P. A; Costa, C.A; Falcão, A. R; Melo, M. N; Falcão, A. L. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 73(2): 123 – 137, 1979a.

Mayrink, W; Williams, P; da Costa, C. A; Magalhães, P. A; Melo, M. N; Dias, M; Oliveira Lima, A; Michalick, M. S; Ferreira Carvalho, E; Barros, G. C; Sessa, P. A; Alencar, J. T. A. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 185; 79(3): 256 – 269, 1985.

Meece, J. K; Reynolds, C. E; Stockwell, P. J; Jenson, T. A; Christensen, J. E; Reed, K. D. Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome B gene. Journal of Medical Entomology, 42: 657 – 667, 2005.

Melchior, L. A. K; Brilhante, A. F; Chiaravalloti-Neto, F. Spatial and temporal distribution of American cutaneous leishmaniasis in Acre state, Brazil. Infectious Diseases of Poverty, 6(1): 99, 2017.

Melo, H. A; Rossoni D. F; Teodoro U. Spatial distribution of cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná, Brazil. PLoS One, 12(9): e0185401, 2017.

Melo, M. N; Mayrink, W; Costa, C. A; Magalhães, P. A; Dias, M; Williams, P; Araújo, F. G; Coelho, M. V; Batista, S. M. Padronização do antígeno de Montenegro. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 19: 161 – 164, 1977.

Menezes, J. A; Ferreira, C; Andrade Filho, J. D; Alessandra, M. S; Morais, M. H. G; Rocha, A. M. S; Machado-Coelho, G. L. L; Lima, F. P; Madureira, A. P; Garcia, T. C; Freitas, C.R; Soares, R. P; Margonari, C. An Integrated Approach Using Spatial Analysis to Study the Risk Factors for Leishmaniasis in Area of Recent Transmission. BioMed Research International, 621854, 2015.

Miranda, J. C; Reis, A; Schriefer, A; Gonçalves, M; Reis, M. G; Carvalho, L; Octavio, F; Barral-Netto, M; Barral, A. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pin-point capture and polymerase chain reaction. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97: 185-188, 2002.

Nascimento, B. W. L; Saraiva, L; Neto, R. G. T; Meira, P. C. L. S; Sanguinette, C. C; Tonelli, G. B; Botelho, H. A; Belo, V. S; Silva, E. S; Gontijo, C. M. F; Andrade Filho, J. D. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state - Brazil. Acta Tropica, 125: 262 – 268, 2013.

Nasser, J. T; Donalisio, M. R; Vasconcelos, C. H. Spatial distribution of American tegumentary leishmaniasis cases in Campinas, State of São Paulo, between 1992 and 2003. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42(3): 309 – 314, 2009.

Neves, R. L; Cardoso, D. T; Rêgo, F. D; Gontijo, C. M; Barbosa, D. S; Soares, R.P. A follow-up study (2007-2018) on American Tegumentary Leishmaniasis in the municipality of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil: Spatial analyses and sand fly collection. PLoS Neglected Tropical Disease, 15: e0009429, 2021.

Nogueira, P. M; Guimarães, A. C; Assis, R. R; Sadlova, J; Myskova, J; Pruzinova, K; Hlavackova, K; Turco, S. J; Torrecilhas, A. C; Volf, P; Soares, R. P. Lipophosphoglycan polymorphisms do not affect *Leishmania amazonensis* development in permissive vectors *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. Parasites & Vectors, 10: 608, 2017.

Núñez-González, S; Gault, C; Simancas-Racines, D. Spatial analysis of dengue, cysticercosis and Chagas disease mortality in Ecuador, 2011-2016. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 113(1): 44 – 47, 2019.

Ogg, M. M; Carrion, R. Jr; Botelho, A. C; Mayrink, W; Correa-Oliveira, R; Patterson, J. L. Short report: quantification of leishmanivirus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 69(3): 309 – 313, 2003.

Oliart-Guzmán, H; Martins, A. C; Mantovani, S. A. S; Braña, A. M; Delfino, B. M; Pereira, T. M; Santos, A. P; Júnior, J. A. F; Branco, F. L. C. C; Campos, R. G; Oliveira, C. S. M; Muniz, P. T; Silva-Nunes, M. Epidemiological profile of American cutaneous leishmaniasis in the amazonian frontier: a retrospective study in Assis Brasil, Acre, Brazil. Revista de Patologia Tropical, 42(2): 187 – 200, 2013.

Oshaghi, M. A; Yaghoobi, F; Vatandoost, H; Abai, M. R; Akbarzadeh, K. *Anopheles stephensi* biological forms, geographical distribution, and malaria transmission in malarious regions in Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9: 294 – 298, 2006.

Paranaíba, L. F; Pinheiro, L. J; Macedo, D. H; Menezes Neto, A; Torrecilhas, A. C. T; Tafuri, W. L; Soares, R. P. P. An overview on *Leishmania (Mundinia) enriettii*: biology, immunopathology, LRV and extracellular vesicles during the host-parasite interaction. Parasitology, 145(10): 1265 – 1273, 2018.

Paranaíba, L. F; Pinheiro, L. J; Torrecilhas, A. C. T; Macedo, D. H; Menezes Neto, A; Tafuri, W. L; Soares, R. P. P. *Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1948): A highly diverse parasite is here to stay. PLoS Pathogens, 13(5): e1006303, 2017.

Pellegrini, A; Kulldorff, M. SaTScan - Manual do Usuário para versão 9.4. 113, 2016.

Peters, N. C; Egen, J. G; Secundino, N; Debrabant, A; Kimblin, N; Kamhawi, S; Lawyer, P; Fay, M. P; Germain, R. N; Sacks, D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 322(5908): 1634, 2008.

Peterson, A; Shaw, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International Journal for Parasitology*, 33: 919 – 931, 2003.

Pimenta, P. F. P. Saraiva, E. M. B; Rowton, E; Modi, G. B; Garraway, L. A; Beverley, S. M; Turco, S. J; Sacks, D. L. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 91: 9155 – 9919, 1994.

Pimenta, P. F. P; Turco, S. J; McConville, M. J; Lawyer, P. G; Perkins, P. V; Sacks, D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, 256(5065): 1812 – 1815, 1992.

Pinto, I. S; Ferreira, A. L; Valim, V; Carvalho, F. S; Silva, G. M; Falcão, A. L; Dietze, R; Falqueto, A. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 37: 90 – 96, 2012.

Pinto, I. S; Santos, C. B; Ferreira, A. L; Falqueto, A. Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 35: 325 – 332, 2010.

Pinto, M. O. K. M; Oliveira, T. M; Aguiar, A. N. A; Pinto, P. E. M; Barbosa, D. S; Diniz, S. A; Silva, M. X. Profile of American tegumentary leishmaniasis in transmission areas in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2007 to 2017. *BMC Infectious Disease*, 20(1): 163, 2020.

Pruzinova, K; Sadlova, J; Seblova, V; Homola, M; Votypka, J; Volf, P. Comparison of Bloodmeal Digestion and the Peritrophic Matrix in Four Sand Fly Species Differing in Susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS ONE*, 10(6): e0128203, 2015.

Pugedo, H; Barata, R. A; França-Silva, J. C; Silva, J. C; Dias, E. S. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(1): 70 – 72, 2005.

Quaresma, P. F; Rêgo, F. D; Botelho, H. A; Silva, S. R; Moura, A. J; Neto, R. G T; Madeira, F. M; Carvalho, M. B; Paglia, A. P; Melo, M. N; Gontijo, C. M. F. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais state, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(10): 579 – 585, 2011.

Queiroz, H. M; Nóbrega, G. N; Ferreira, T. O; Almeida, L. S; Romero, T. B; Santaella, S. T; Bernardino, A. F; Otero, X. L. The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? *Science of the Total Environment*, 637 – 638: 498 – 506, 2018.

- Ready, P. D. Leishmaniasis emergence and climate change. *Revue scientifique et technique*, 27: 399 – 412, 2008.
- Rêgo, F. D; Rugani, J. M. N; Shimabukuro, P. H. F; Tonelli, G. B; Quaresma, P. F; Gontijo, C. M. F. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá indigenous reserve, Brazil. *PLoS One*, 10: e0122038, 2015.
- Rêgo, F. D; Shimabukuro, P. H. F; Quaresma, P. F; Coelho, I. R; Tonelli, G. B; Silva, K. M. S; Barata, R. A; Dias, E. S; Gontijo, C. M. F. Ecological aspects of the Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in the Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. *Parasites & Vectors*, 7: 220, 2014.
- Reithinger, R; Dujardin, J. C; Louzir, H; Pirmez, C; Alexander, B; Brooker, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7: 581 – 596, 2007.
- Rocha, A. T. F; Espindola, G. M; Soares, M. R. A; Rocha, J. R. S; Costa, C. H. N. Visceral leishmaniasis and vulnerability conditions in an endemic urban area of Northeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 112(7): 317 – 325, 2018.
- Rojas, C. A; Weigle, K. A; Barrera, L; Collazos, C. Surveillance and screening of American cutaneous leishmaniasis by Colombian primary health care workers using a clinical prediction rule. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(4): 405 – 410, 2002.
- Ross, R. Further notes on Leishman's bodies. *The British Medical Journal*, 2(2239): 1401, 1903.
- Sacks, D. L; Perkins, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, Washington, 2233: 1417 – 1419, 1984.
- Sacks, D; Kamhawi, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, 55: 453 - 483, 2001.
- Salomón, O. D; Sosa-Estani, S; Ramos, K; Orellano, P. W; Sanguesa, G; Fernández, G; Sinagra, A; Rapascioli, G. Tegumentary leishmaniasis outbreak in Bella Vista City, Corrientes, Argentina during 2003. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(7): 767 – 774, 2006.
- Sanguinette, C. C; Silva, D. F; Stumpp, R. G. A. V; Rego, F. D; Tonelli, G. B; Tanure, A; Gontijo, C. M. F, Andrade-Filho, J. D. Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil. *Parasites & Vectors* 8: 428, 2015.
- Saraiva, L; Leite, C. G; Lima, A. C. V. M. R; Carvalho, L. O. A; Pereira, A. A. S; Rugani, J. M. N; Rego, F. D; Gontijo, C. M. F; Andrade Filho, J. D. Seasonality of sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* DNA detection in vector species in an area with endemic visceral leishmaniasis. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(4): 309 – 318, 2017.
- Schallig, H. D; Silva, E. S; Meide, W. F; Schoone, G. J; Gontijo, C. M. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(3): 387 – 393, 2007.



Schonian, G; Nasereddin, A; Dinse, N; Schweynoch, C; Schallig, H. D; Presber, W; Jaffe, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47: 349 – 358, 2003.

Scott, R. P. Família, Gênero e Saúde na Zona da Mata de Pernambuco. *In: Anais da Reunião Brasileira de Estudos Populacionais*, 1071 – 1093, 2016.

Seneviratue, S. L; Gunatilake, S. B; Silva, H. J. Reporting notifiable diseases: methods for improvement, attitudes and community outcome. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(2): 135 – 137, 1997.

Shimabukuro, P. H; Silva, T. R; Ribeiro, F. O; Baton, L. A; Galati, E. A. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of Sao Paulo, Brazil. *Parasites & Vectors*, 3: 121, 2010.

Silva, N. S; Muniz, V. D. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Amazônia brasileira. *Cadernos de Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz*, 25: 1325 – 1336, 2009.

Silva, N. S; Viana, A. B; Cordeiro, J. A; Cavasini, C. E. American cutaneous leishmaniasis in the State of Acre, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 33(6): 554 – 559, 1999.

Silva, S. O; Wu, A. A; Evans, D. A; Vieira, L. Q; Melo, M. N. *Leishmania* sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as *Leishmania major*-like. *Acta Tropica*, 112(3): 239 – 248, 2009.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvmg.def> acessado em 18 de janeiro de 2023.

Souza, R. F; Santos, Y. L; Vasconcellos, R. S; Borges-Pereira L; Caldas, I. S; Almeida, M. R; Bahia, M. T; Fietto, J. L. R. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Tropica*, 125(1): 60 – 66, 2013.

Souza, V. A; Cortez, L. R; Dias, R. A; Amaku, M; Neto, J. S. F; Kuroda, R. B. S; Ferreira, F. Space-time cluster analysis of American visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 28(10): 1949 – 1964, 2012.

Tanure, A; Rêgo, F. D; Tonelli, G. B; Campos, A. M; Shimabukuro, P. H. F; Gontijo, C. M. F; Andrade Filho, J. D. Diversity of phlebotomine sand flies and molecular detection of trypanosomatids in Brumadinho, Minas Gerais, Brasil. *PLoS ONE*, 15(6): e0234445, 2020.

Teixeira-Neto, R. G; Silva, E. S; Nascimento, R. A; Belo, V. S; Oliveira, C. D; Pinheiro, L. C, Gontijo, C. M. F. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. *Parasites & Vectors*, 7: 485, 2014.

Temponi, A. O. D; Brito, M. G; Ferraz, M. L; Diniz, S. A; Cunha, T. N; Silva, M. X. (2018). Ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar americana: uma análise multivariada dos

circuitos espaciais de produção, Minas Gerais, Brasil, 2007 a 2011. *Cadernos de Saúde Pública*, 34(2), e00165716, 2018.

Tonelli, G. B; Binder, C; Nogueira, V. L. C; Prado, M. H; Theobaldo, G. G; Campos, A. M; Souza, C. M; Andrade-Filho, J. D. The sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the urban area of Lassance, Northeast Minas Gerais, Brazil. *PLoS One* 16: e0257043, 2021.

Tonelli, G. B; Tanure, A; Rêgo, F. D; Carvalho, G. M. L; Simões, T. C; Andrade Filho, J. D. Aspects of the ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the private natural heritage reserve sanctuary Caraça. *PLoS One*, 12: e0178628, 2017.

Vieira, C. P; Oliveira, A. M; Rodas, L. A; Dibo, M. R; Guirado, M. M; Chiaravalloti Neto, F. Temporal, spatial and spatiotemporal analysis of the occurrence of visceral leishmaniasis in humans in the City of Birigui, State of São Paulo, from 1999 to 2012. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(3): 350 – 358, 2014.

Vieira, V. R; Azevedo, A. C. R; Alves, J. R. C; Guimarães, A. E; Aguiar, G. M. Ecological Aspects of Phlebotomine Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Areas of American Cutaneous Leishmaniasis, in the Municipality of Paraty, Rio de Janeiro, Brazil. I-Index of Abundance by Location and Type of Capture. *Journal of Medical Entomology*, 52: 886 – 895, 2015.

Virgens, T. M; Santos, C. B; Pinto, I. S; Silva, K. S; Leal, F. C; Falqueto, A. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo state, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 24: 2969 – 2978, 2008.

Volf, P; Myskova, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology*, 23(3): 91 – 92, 2007.

Von Stebut, E. Leishmaniasis. *Journal of the German Society of Dermatology*, 13(3): 191 – 200, 2015.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 2010.

Wu, Â. C; Freitas, M. A; Silva, S. O; Nogueira, P. M; Soares, R. P; Pesquero, J. B; Gomes, M. A; Pesquero, J. L; Melo, M. N. Genetic differences between two *Leishmania major*-like strains revealed by suppression subtractive hybridization. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 203(1 – 2): 34 – 38, 2015.

Yadón, Z. E; Quigley, M. A; Davies, C. R; Rodrigues, L. C; Segura, E. L. Assessment of leishmaniasis notification system in Santiago del Estero, Argentina, 1990 – 1993. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(1): 27 – 30, 2001.

Yeshiwondim, A. K; Gopal, S; Hailemariam, A. T; Dengela, D. O; Patel, H. P. Spatial analysis of malaria incidence at the village level in areas with unstable transmission in Ethiopia. *International Journal of Health Geographics*, 8: 5, 2009.

Yuill, R. S. The Standard Deviational Ellipse: An Updated Tool for Spatial Description. *Geografiska Annaler. Series B, Human Geography*, 53(1): 28 – 39, 1971.

## ANEXOS

**Anexo 1 – Artigo 1 – Neves *et al.*, 2021. A follow-up study (2007 – 2018) on American Tegumentary Leishmaniasis in the municipality of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil: Spatial analyses and sand fly collection.**

## PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

## RESEARCH ARTICLE

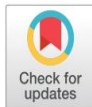
## A follow-up study (2007–2018) on American Tegumentary Leishmaniasis in the municipality of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil: Spatial analyses and sand fly collection

Rafael L. Neves<sup>1</sup> , Diogo T. Cardoso<sup>2</sup> , Felipe D. Rêgo<sup>1</sup> , Célia M. F. Gontijo<sup>1</sup> , David S. Barbosa<sup>2</sup> , Rodrigo P. Soares<sup>1\*</sup> 

**1** René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Parasitology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

© These authors contributed equally to this work.

\* [rodrigo.soares28@hotmail.com](mailto:rodrigo.soares28@hotmail.com)



### Abstract

#### Background

The municipality of Caratinga is an important endemic area for American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) and no epidemiological studies were performed during the past two decades. Here, we analyzed the epidemiological situation and the geographical distribution of ATL cases in the municipality of Caratinga from 2007 to 2018 using geographic information systems (GIS). Also, we evaluated the impact of several demographic parameters in ATL distribution and the sand flies incriminated in its transmission.

#### Methods

All demographic information (gender, age, educational level, clinical form, diagnostic criteria and case evolution) used in this study was retrieved from the public health archives and confirmed in the State Health Services databases. All cases were analyzed using GIS software based on ATL distribution. Also, non-systematic sand fly collections and molecular detection of *Leishmania* were performed in the hotspots.

#### Results and conclusions

During the period, ATL cases continued and increased especially in the past years (2016–2018). Hotspots included urban Caratinga areas and the districts of Patrocínio de Caratinga and Sapucaia. The species *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia intermedia*, *Migonemyia migonei* and *Evandromyia cortelezzii* complex were captured. However, ITS1-PCR did not detect *Leishmania* DNA in those insects. Based on our analyses, urbanization of ATL in Caratinga has occurred in the past years. Due to the increase in the number of cases and vectors presence, it is recommended that health authorities focus on control measures in the most affected areas (Patrocínio de Caratinga and Sapucaia districts and urban Caratinga).

#### OPEN ACCESS

**Citation:** Neves RL, Cardoso DT, Rêgo FD, Gontijo CMF, Barbosa DS, Soares RP (2021) A follow-up study (2007–2018) on American Tegumentary Leishmaniasis in the municipality of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil: Spatial analyses and sand fly collection. *PLoS Negl Trop Dis* 15(5): e0009429. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429>

**Editor:** Shan Lv, National Institute of Parasitic Diseases, CHINA

**Received:** December 4, 2020

**Accepted:** April 30, 2021

**Published:** May 18, 2021

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429>

**Copyright:** © 2021 Neves et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** RPS and CMFG are research fellows of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (302972/2019-6; 305430/2017-3) ([www.cnpq.br](http://www.cnpq.br)) RLN was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES) (8881.309862/2018-01) (<https://www.gov.br/capes/pt-br>). This study was partially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel Vice-Presidência de Educação, (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) - Finance Code 001. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Author summary

Leishmaniasis is an important health problem in Latin American countries and world-wide. In some places, notification is limited and underreported hindering correct assessment of existing data. In Brazil, ATL is mainly caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. It is transmitted by sand fly vectors *Nyssomyia whitmani* and *Nyssomyia intermedia*. ATL comprises different clinical manifestations including cutaneous leishmaniasis, muco-cutaneous leishmaniasis and atypical leishmaniasis. The objective is to present the spatial distribution of cases of ATL notified by the Public Health System of Caratinga between the period of 2007 and 2018. This city is one of the most important endemic areas in the State of Minas Gerais and compose the panel of knowledge on epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis*. This information will be important for developing strategies for ATL control in the affected areas. There is strong evidence that supports ATL urbanization in the city of Caratinga and increase of cases in two rural districts (Sapucaia and Patrocínio de Caratinga).

## Introduction

Caratinga is a city located in the Rio Doce Valley in the eastern part of Minas Gerais State, Brazil. It is an urbanized city surrounded by a vast rural area of coffee crops. For this reason, a high number of ATL cases are reported mainly in rural workers occupationally exposed. Outbreaks of ATL have been occurred since the 1960s and this phenomenon attracted pioneer researchers to this endemic area. They were conducted by Dr. Mayrink's group and most of the knowledge regarding ATL management in Brazil was originated from these studies [1].

Historically, the presence of his group together with the local Health authorities was responsible for creating a Reference Center on Leishmaniasis in the town. This facility enabled to diagnose, treat, and follow ATL patients for several decades [2]. Besides, several eco-epidemiological studies on sand fly vectors, reservoirs and immunotherapy trials were also developed in the area helping to control the disease [3,4]. Those measures included early diagnosis, patient treatment and spraying houses with insecticides and successfully controlled ATL in some areas [5].

Regarding patient management, the reference center of Caratinga was very important for standardization of Montenegro's skin test that is currently obsolete [4,6,7]. This test was successfully employed in field trials for testing a so-called vaccine against the disease. In fact, the vaccine consisted of a mixture of *Leishmania* parasite strains/species used as immunotherapy, a procedure that is no longer available. Most of the patients were still positive after these trials suggesting long-lasting immune response. In these patients, no ATL episodes were reported in the following years after the research [8]. Later, those trials were also evaluated in other endemic areas including the neighboring State of Espírito Santo and the Amazon basin with successful results [9,10].

Besides the clinical reports in humans, several eco-epidemiological studies were carried out in Caratinga. At that time, in the 1970s, *Leishmania (Viannia) braziliensis* was the main etiological agent of ATL in the region. Interestingly, in some of these strains was detected the presence of LRV1 virus [11], known to increase the severity of the disease [12]. Later, two *Leishmania major* strains were identified among the parasites isolated from patients. This finding was very surprising since this species is commonly found in the Old World and was isolated from rural workers that had never left the region [13]. It is still unknown how *L. major* was introduced in the area and the vector incriminated in its transmission. A sand fly survey

performed in the rural areas detected the presence of *Nyssomyia whitmani* and *Migonemyia migonei* [1]. Although the latter is a permissive vector, its role in the transmission of *L. major* is yet to be determined [14,15]. Regarding reservoirs, the presence of *Leishmania* parasites was found in dogs but not in wild rodents [3]. This is expected since in wild reservoirs the parasitemia is very low and at that time sensitive molecular techniques were not available [16,17]. Altogether, the above-mentioned studies were very important to understand several epidemiological aspects of ATL in the New World. This knowledge was applied to other regions and perhaps countries in Latin America. Unfortunately, in the early 2000s, the Reference Center of Leishmaniasis in Caratinga was closed and ATL studies ceased. The patients continued to be referred to the city public health system. However, an important gap remains in the past two decades since no information on the disease dynamics was reported.

Since the 1990s, geographic information systems (GIS) and special analysis methods have become valuable tools for epidemiological studies in the health field not only in infectious but also in non-infectious diseases [18–21]. Those analyses may help local governments to formulate health policies and monitor affected areas of a given disease [22–27]. In the case of Leishmaniasis, those tools have been used in the last decade for visceral and cutaneous leishmaniasis [28,29]. Due to its occupational and environmental features ATL spatial studies have been reported in Latin America showing specific differences according to the country [30]. In general, ATL transmission is affected by several factors including environmental degradation, work activities, vector proliferation and proximity to water collections [31]. Although most studies have shown a correlation between gender and occupational exposure in several countries [30, 32], this feature may not be clear in others [30]. Although ATL may be related to forested areas, GIS have found potential peridomestic and urban areas of transmission in Northern Argentina [32,33]. In Brazil, although most of the ATL cases occurs in the Amazon region, the epidemiological scenarios vary largely in the country. In the Northern state of Pará, the main risk factors associated with ATL transmission were deforestation and sand fly proliferation [27]. In Acre state, the pattern of transmission varies within the state [34]. In some areas occurs intra/peridomestic transmission whereas in others it has a forest/sylvatic cycle. In the southeast state of São Paulo, several studies have been carried out in different cities including Teodoro Sampaio, Bauru and Campinas [23,25,29]. Depending on the city, peridomestic/urban transmission and/or sylvatic transmission may be observed. This analysis has not been performed in the city of Caratinga, one of the high priority municipalities in Minas Gerais state [35].

Minas Gerais is one of the Brazilian states with higher transmission rates in the country. In 2015, an ecological accident in a mining area resulted in huge contamination of Doce river, the major water supply in the area. This event resulted in serious environmental and economic damage to the local population [36,37]. However, its impact on vector-borne diseases such as leishmaniasis is still uncertain. Recently, two studies have demonstrated that five mesoregions including the North and River Doce Valley, where Caratinga is located are the most seriously affected by ATL [35,38]. These studies showed that several areas in the state of Minas Gerais exhibit a moderate to high risk of transmission in peri-urban areas as a result of ecological features and vector diversity. In this region, the most vulnerable populations included children, pregnant women and indigenous. However, no information on ATL cases and their special distribution have been reported in the past twenty years in the region of Caratinga.

As a wider study on ATL epidemiology in Minas Gerais, this study aimed to analyze the spatial distribution of this disease from 2007 to 2018, sand fly presence and *Leishmania* infection. This information may elucidate the current status of its transmission and help the health authorities to monitor and prevent further ATL outbreaks in the municipality of Caratinga, Minas Gerais, Brazil.

## Materials and methods

### Ethical statement

This Project was approved by the Brazilian Ethical Committee of Research (CEP) under the license #3.997.721.

### Study area

The study was carried out in the municipality of Caratinga (19°47'25"S and 42°8'21"W), located in the Rio Doce Valley and belongs to the metropolitan region of Steel Valley, located about 310 km east of the capital Belo Horizonte in the state of Minas Gerais, Brazil. The municipality has a tropical climate and occupies an area of 1,258.479 km<sup>2</sup>, of which 15.9 km<sup>2</sup> are in an urban area, and its population in 2020 was 93,603 inhabitants. In the Gross Domestic Product (US\$ 3,410.74), the areas of industry and service provision stand out, however agriculture and livestock also represent a relevant participation, especially with coffee production. Caratinga metro area includes ten districts: Cordeiro de Minas, Dom Lara, Dom Modesto, Patrocínio de Caratinga, Santa Efigênia de Caratinga, Santa Luzia de Caratinga, Santo Antônio do Manhuaçu, Sapucaia, São Cândido and São João Jacutinga (Fig 1).

### Data collection and spatial analysis

First, the number of ATL cases (2007–2018) was evaluated based on the data from the municipal health service. Identification of patients was kept confidential. Demographic information including gender, age, educational level, clinical form, diagnostic criteria and case evolution were assessed. Then, to analyze their spatial distribution they were grouped into 4 three-year intervals (2007–2009; 2010–2012; 2013–2015 and 2016–2018). These intervals minimize the ATL fluctuations occurring each year as reported elsewhere [35].

**Bayesian analysis.** The incidence rates were re-estimated for each of the geographic analytical units and for each three-year period, using Bayesian empirical spatial smoothing. After calculating the incidence rate, the accumulated smoothed incidence rate (three-year period) (Bayesian spatial smoothing) was calculated for each demographic sector. A first-order adjacency matrix was created, and the smoothing was performed to reduce random fluctuation. This facilitates the subsequent analysis of spatial data, since areas with small populations and few cases may imply great variation in their rates [35]. This analysis used GeoDa software version 1.14 (ASU, GeoDa Center for Geospatial Analysis and Computation, Arizona, USA).

**Directional Distribution Ellipses** provides a spatial distribution of events in two directions: cluster identification and orientation. The largest axis defines the direction of maximum distribution dispersion, while the smallest is perpendicular to the previous axis and defines the minimum dispersion [39]. The application of directional distribution was employed using the QGIS Software version 3.4.14 'Madeira'.

**Kernel Density Maps** were used to identify the level of clusters, hotspots, of the ATL cases. Each observation is weighted according to a central distance. This creates a continuous surface that represents where the densities are located [40]. QGIS software version 3.4.14 'Madeira' was used for determining Kernel density maps using an influence radius of 600m.

**Scanning analysis of space-time clusters.** This analysis was performed by gradually scanning information in space and time, indicating the number of events observed and expected within each unit of analysis [41,42]. To identify spatio-temporal clusters, scanning statistics were applied, using the SaTScan 9.4.4 software [42].

The identification of spatio-temporal clusters was made using the Poisson discrete model [42,43]. The spatio-temporal scanning techniques were configured to detect clusters of high

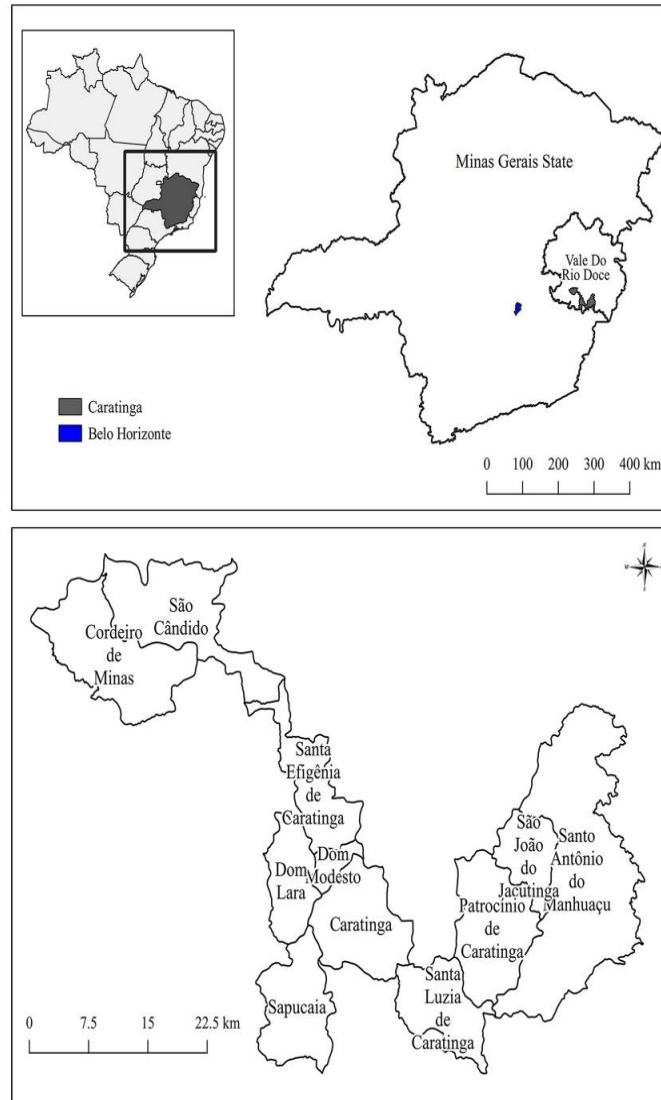


Fig 1. Location of the municipality of Caratinga and their districts in the state of Minas Gerais, Brazil ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.g001>

and low risk for the transmission of ATL. The significance test of the identified clusters was based on the comparison of a null distribution obtained by Monte Carlo simulation [41,42] and relative risks (RR) of each cluster were determined.

**Spatial regression.** Ordinary Least Square (OLS) model, a global spatial analytical method was performed [44]. Population, garbage dumped in wasteland, income up to ½ minimum

wage, afforestation in the streets and residence without sewage collection were included as explanatory variables. This analysis generates the Akaike Information Criterion (AIC). Those data for each census sector was obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) until 2010 [45].

**Sand fly captures.** Sand fly captures were authorized by Ministry of Environment of Brazil (protocol # 15237–2). Based on the previous results, sand flies were captured in the most affected areas for ATL. Two captures (July and September 2020) were performed in four neighborhoods of Caratinga (Anápolis, Esplanada, Downtown and Limoeiro) and in the rural areas (Patrocínio de Caratinga and Sapucaia). The captures were performed using HP traps [46] for two nights. Captured insects were conditioned in a 50mL Falcon Tube containing glycerin alcohol prior to taxonomic identification.

**Leishmania detection.** After sex screening, females were subjected to DNA extraction for *Leishmania* detection using PCR amplification of Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) [47]. In all reactions, a negative control (sterile water as template), positive control with 20 nanograms of DNA extracted from reference strains of *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) and *L. major* (MHOM/IL/81/Friedlin), were used. Positive samples were submitted to digestion by the restriction enzyme *HaeIII* to identify *Leishmania* species [48].

## Results

Notification records (319) were retrieved from the Caratinga Health Service from January 2007 to December 2018. Males (57.37%) represented the majority of the ATL cases followed by females (42.63%) (183 versus 136). Age averages were  $33.26 \pm 19.87$  and  $35.19 \pm 19.87$  for men and women, respectively. Most of the individuals analyzed (79.94%) had a low level of education. Localized cutaneous lesions were the most prevalent form of the disease (97.49%). ATL cases (84.01%) were concentrated in the countryside and 94.04% have evolved to cure after Glucantime therapy (Table 1).

ATL cases peaked between 2009–2011 and increased after 2015 (Fig 2). All cases (100%) were notified as being from Caratinga. However, in some records (101) this information was not assessed. During the years 2010 and 2018, the highest ATL numbers were recorded. Consistent with this information the total incidence rates per 10,000 inhabitants also followed this pattern, ranging from 0.72 in 2007 to 6.57 in 2010, year with the highest incidence. The average incidence in the municipality of Caratinga was 3.01 (Table 2). The district of Patrocínio de Caratinga contributed with 45.77% of the cases. The other districts contributed with a smaller number of cases, with eight cases in Dom Modesto (2.51%), four cases in Cordeiro de Minas and Dom Lara (1.25%) and two cases in São Cândido (0.63%) (Table 3).

In general, after Bayesian analysis (Fig 3), the smoothed incidence was lower in the 2007–2009 period compared to the others. During this time, no incidence above 100/10,000 inhabitants was detected and ATL cases were absent in some districts including Cordeiro de Minas and São Cândido. In the subsequent periods, this incidence increased above 100/10,000 inhabitants including the urban area of Caratinga (2010–2012) and the rural areas of Patrocínio de Caratinga (2010–2018), Santo Antônio do Manhuaçu (2010–2012; 2016–2018) and Sapucaia (2016–2018). When the same analysis was applied to the urban area of Caratinga we also detected an increase in the incidence in the northeast part of the city (2010–2012) and in the southwest (2013–2018) (Fig 4).

In general, directional distribution ellipses showed that the spatial distribution of ATL cases in Caratinga remained unchanged between 2007–2018. In the first three years (2007–2009), the ellipse comprised cases located in the rural areas. After 2010, the ellipses shift towards urban areas of the municipality (Fig 5).



Table 1. Demographic and clinical features of ATL cases in the municipality of Caratinga (2007–2018).

Feature	n (%)		%
<b>Gender</b>			
Male	183		57.37
Female	136		42.63
<b>Age group (years) by gender</b>	Male	Female	
<1	1 (0.55)	0 (0)	0.31
1–10	18 (9.84)	19 (13.97)	11.60
11–20	46 (25.14)	19 (13.97)	20.38
21–30	27 (14.75)	18 (13.24)	14.11
31–40	25 (13.66)	28 (20.59)	16.61
41–50	22 (12.02)	23 (16.91)	14.11
51–60	23 (12.57)	11 (8.09)	10.66
61–70	14 (7.65)	12 (8.82)	8.15
71–80	7 (3.83)	3 (2.21)	3.13
≥81	0 (0)	3 (2.21)	0.94
<b>Education level</b>			
Illiterate	8		2.51
Incomplete elementary school	243		76.18
Complete primary education	4		1.25
High school	2		0.63
No school age	19		5.96
Uninformed	31		9.72
Ignored	12		3.76
<b>Clinical form</b>			
Cutaneous	311		97.49
Mucocutaneous	8		2.51
<b>Case outcome</b>			
Clinical cure	300		94.04
Abandonment treatment	7		2.19
Death of other cause	1		0.31
Transferred	1		0.31
Not informed	10		3.13
<b>Area of notification</b>			
Urban	42		13.17
Periurban	9		2.82
Rural	268		84.01

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.t001>

Kernel density maps detected several hotspots including the district of Patrocínio de Caratinga (all years), the urban area of Caratinga city (all years) and the district of Sapucaia (2007–2009, 2010–2012 and 2016–2018) (Fig 6A–6D). To confirm if the human cases were occurring in the urban area, we repeated the analysis excluding all records whose exact addresses were missing. This selection enabled the analysis of 39 cases (Fig 7). Although some cases were observed between 2007 and 2009, after 2010, an increase in the hotspots was detected in the central and southwest parts of the city.

To refine our previous findings and determine the spatial relative risk (RR), we performed cluster scan analysis including other variables. This analysis identified two areas (low and high) risk for ATL transmission (Fig 8). The low-risk cluster was the urban part of Caratinga,

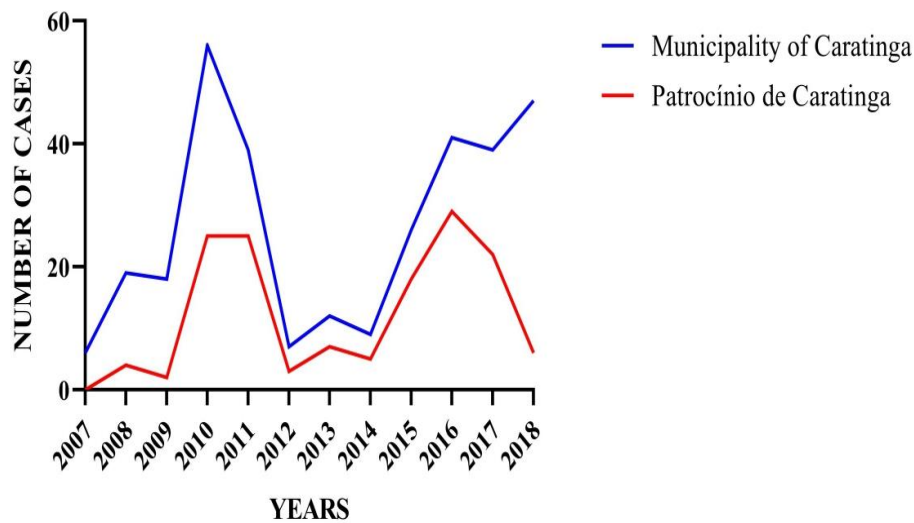


Fig 2. Distribution of ATL cases in the city of Caratinga and in the district of Patrocínio de Caratinga.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.g002>

with a relative risk (RR) of 0.1 in the period from 2011 to 2016. The high-risk cluster encompassed the rural area, this cluster had a RR of 27.6 in the period from 2013 to 2018 (Fig 8).

To detect if demographic aspects of the region could affect the spatial distribution of the cases, a regression analysis (OLS) was performed in the entire study area. The variables income of up to half a minimum wage and garbage dumped in vacant lots affected ATL incidence ( $P < 0.05$ ) (Table 4). In the urban area, trees in the street were the only variable affecting ATL incidence ( $P < 0.05$ ) (Table 5).

To investigate the presence of sand flies and perhaps, *Leishmania* infection, a total of 113 insects were captured from July to September. Fifty-nine females (52.21%) and 54 males

Table 2. Number of cases, population and incidence of ATL cases in the municipality of Caratinga (2007–2018).

Year	n	Population	Incidence*
2007	6	83,363	0.72
2008	19	84,825	2.24
2009	18	85,469	2.11
2010	56	85,239	6.57
2011	39	85,811	4.54
2012	7	86,364	0.81
2013	12	89,578	1.34
2014	9	90,192	1.00
2015	26	90,782	2.86
2016	41	91,342	4.49
2017	39	91,841	4.25
2018	47	91,503	5.14
Total	319	Average	3.01

\*Per 10,000 inhabitants

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.t002>

Table 3. Number of ATL cases by city/district during the period from 2007 to 2018.

City/district	n	%
Caratinga	63	19.75
Cordeiro de minas	4	1.25
Dom Lara	4	1.25
Dom Modesto	8	2.51
Patrocínio de Caratinga	146	45.77
Santa Efigênia	18	5.64
Santa Luzia	11	3.45
Santo Antônio do Manhuaçu	19	5.96
São Cândido	2	0.63
São João do Jacutinga	15	4.70
Sapucaia	29	9.09

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.t003>

(47.79%) were identified belonging to four species: *Ny. intermedia* (13.27%), *Ny. whitmani* (82.30%), *Evandromyia complex cortezzii* (1.77%) and *Mi. migonei* (2.65%) (Table 6). None of the 59 captured females tested positive for the presence of *Leishmania* DNA.

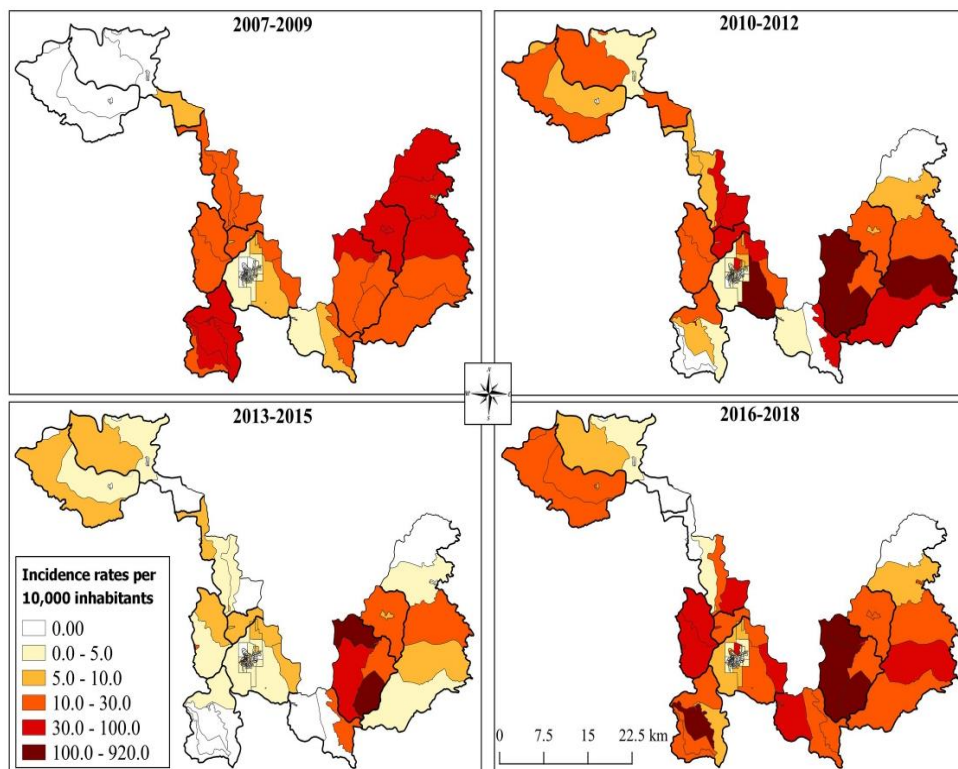


Fig 3. Smoothed Accumulated Incidence, per 10,000 inhabitants, of ATL cases belonging to the municipality of Caratinga ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.g003>

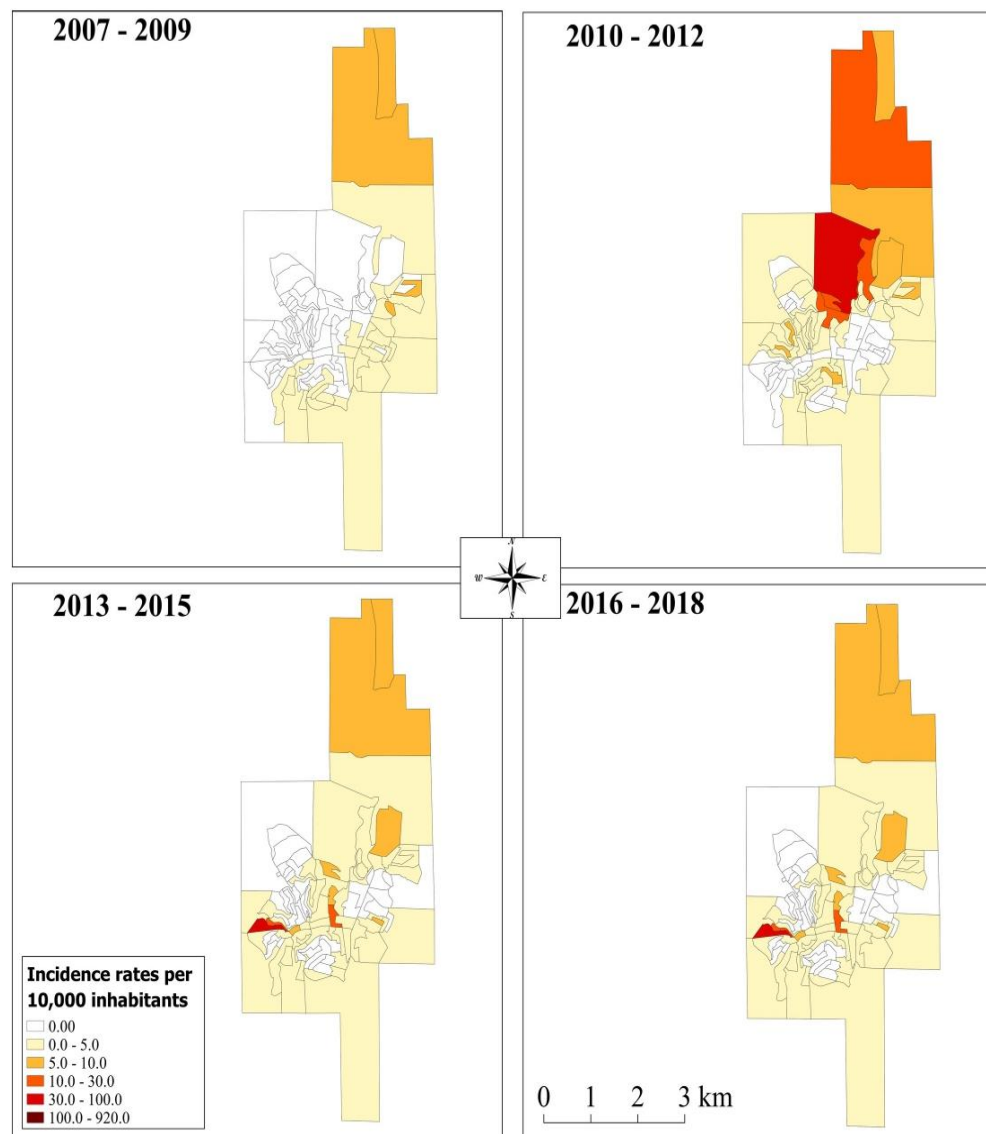


Fig 4. Smoothed Accumulated Incidence, per 10,000 inhabitants, of ATL cases belonging to the urban area of Caratinga ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.g004>

### Discussion

The municipality of Caratinga is included in one of the mesoregions most affected by ATL in the state of Minas Gerais [35]. Previous reports in the Brazilian states of Paraná [24], São Paulo [29], Amazonas [49] and Minas Gerais [38] showed that demographically ATL is primarily a

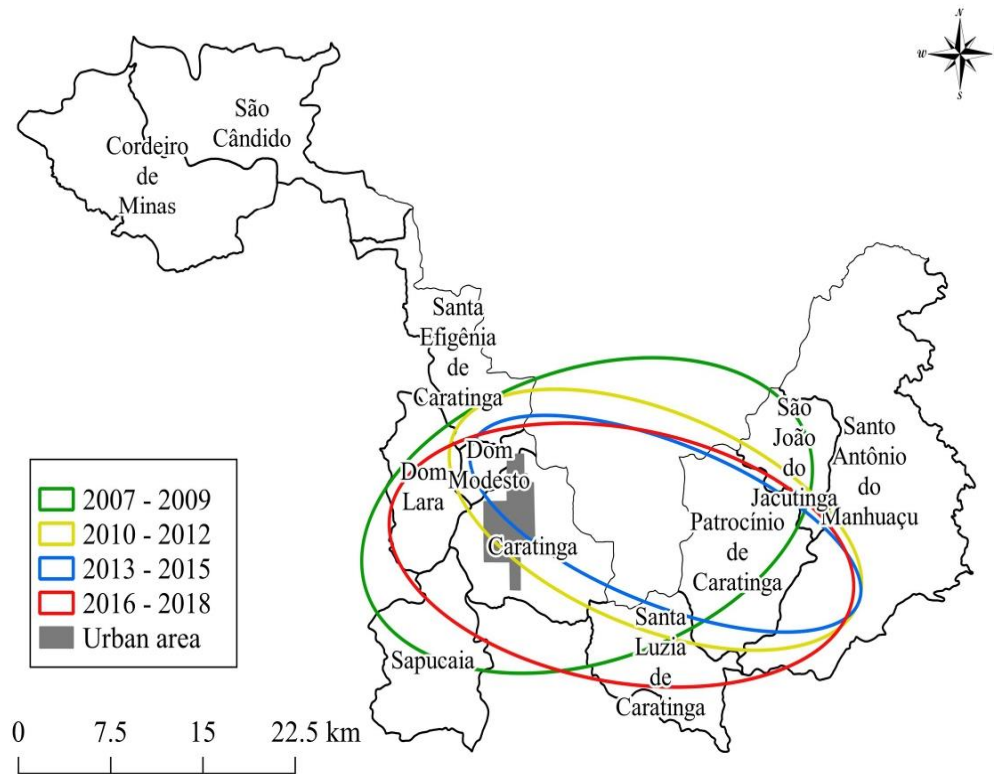


Fig 5. Ellipse showing the distribution of cases of ATL over a period of three years during the period 2007–2018 ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.g005>

rural disease affecting males and low educated individuals, a profile confirmed by our demographic analysis. Our results, together with those of Melo et al., 2017 [24], showed that the cutaneous leishmaniasis is the most prevalent form (~98%) and chemotherapy is the main prophylactic control measure. It is interesting to notice that despite the fact that most cases are from rural origin, a considerable number of cases were notified as urban based on Bayesian and Kernel analysis. Most of the rural cases were found mainly in the districts of Patrocínio de Caratinga and Sapucaia. However, a high frequency of urban cases was detected, and two reasons may be considered in this scenario: 1) those patients live in the urban area and frequently travel to the surrounding rural areas, a common situation since it is very usual to have a cabin in the countryside and, 2) transmission could also be occurring in the urban area. There was no homogeneity in the incidence rates in the evaluated period. The low incidence rates observed between those peaks could be a result of several notification-derived factors including underreporting. This is a constant issue not only in Brazil, but also in several other endemic places including Argentina and Colombia [50–55]. After 2015, an increase in the ATL incidence was noticed, probably due to diagnosis improvement, disease transmission increase or both. This also confirms previous findings in other Brazilian endemic regions [56–58] and could be justified by anthropic actions, socioeconomic pressure, and disordered urbanization.

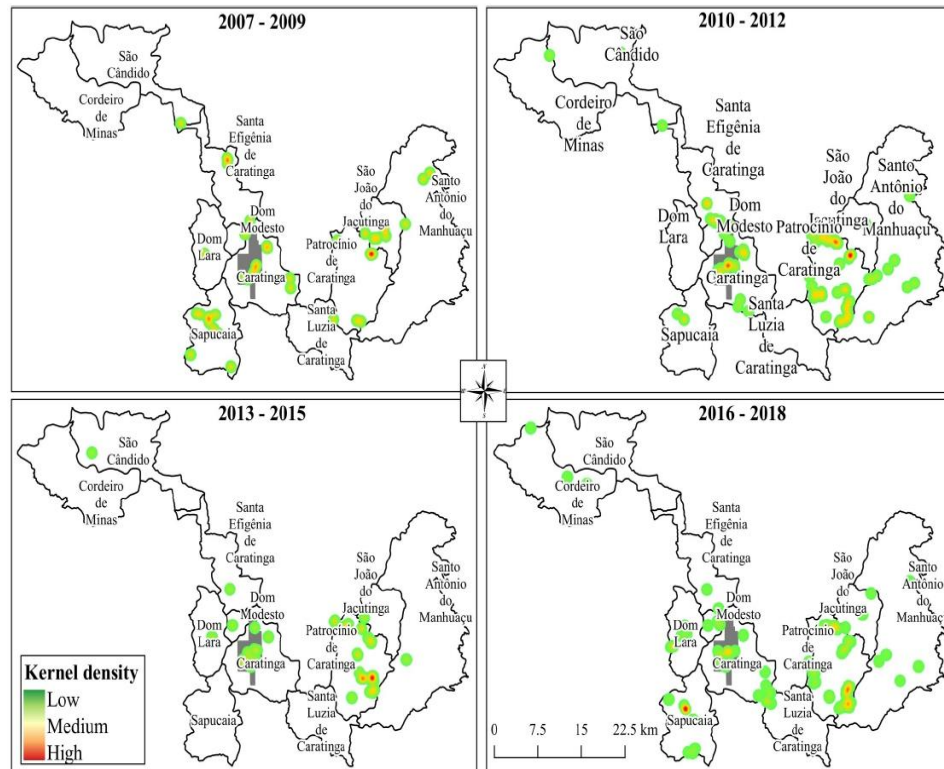


Fig 6. Kernel density of ATL cases in the municipality of Caratinga ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.g006>

These phenomena may contribute to sand fly distribution and, consequently for ATL transmission. However, it is very clear a shift in the distribution of cases caused by an increase in the number of ATL cases in Sapucaia especially between 2016–2018. Those data reinforce that together with Patrocínio de Caratinga, Sapucaia must undergo stricter surveillance since in rural districts, this increase may be related to agricultural expansion and proximity to sand flies [59–61].

It is important to notice that the urban area of Caratinga has always shown hotspots in the entire period. In Brazil, urbanization is often reported for visceral leishmaniasis, where major cities have become endemic areas for *Leishmania infantum* [28,62,63]. As we mentioned before, the constant presence of urban cases in Caratinga deserves more attention and may indicate recent urbanization of ATL. The residents may have acquired the disease not only in the countryside but also in the city. The hotspot located in the north part of the city is very urbanized and close to a quarry. The hotspot located in the southwest is primarily a residential area. After relative risk (RR) analysis, the city of Caratinga and district of Patrocínio de Caratinga represents low and high areas for ATL transmission, respectively. This reinforces the need to prioritize ATL surveillance and control measures in these locations, especially where the highest risk is concentrated [64–67].

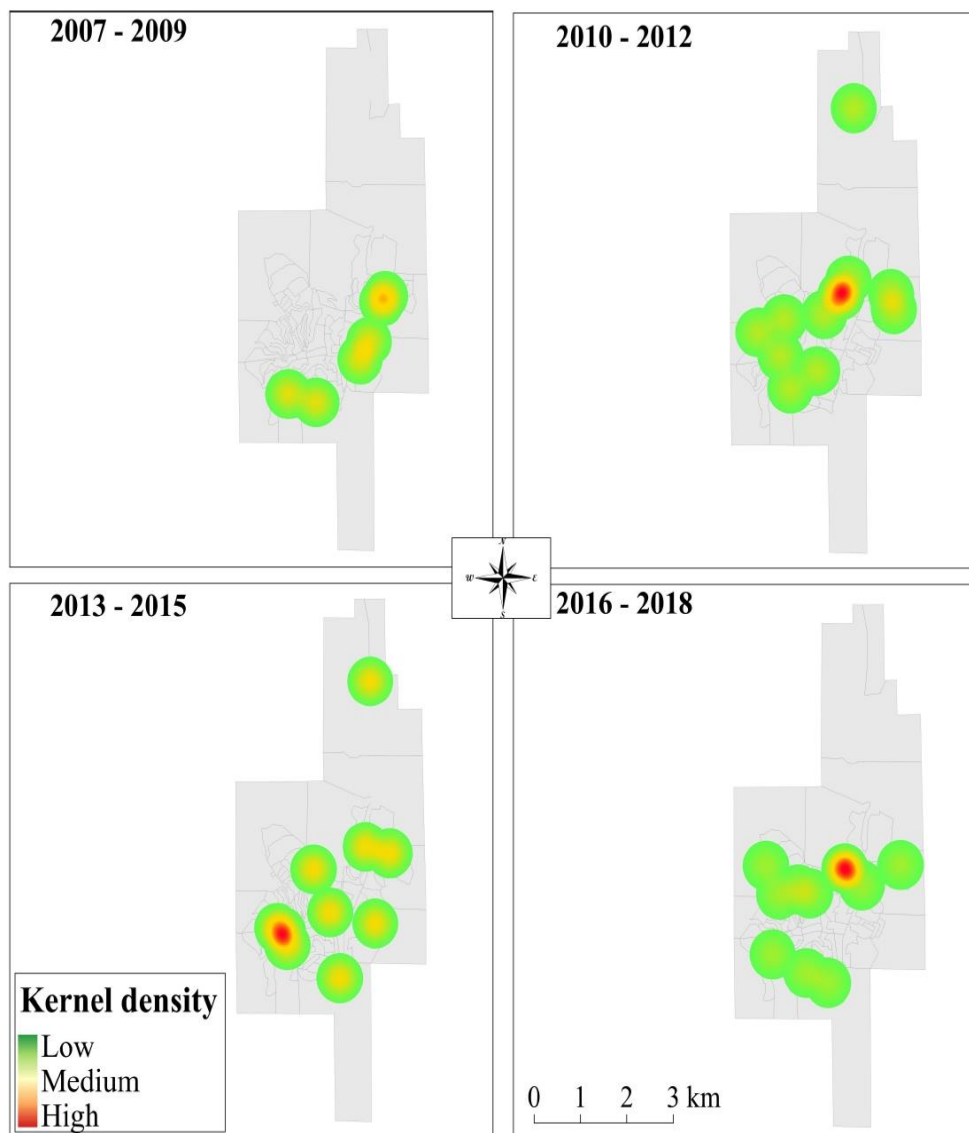


Fig 7. Kernel density of cases of ATL in the city of Caratinga ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.g007>

After OLS analysis, 56% of ATL cases in Caratinga can be explained by income and waste disposal in vacant lots. Our results suggest that ATL is related to poverty and lack of basic sanitation conditions in the entire municipality of Caratinga. In the urban area, 5% of ATL cases can be explained by the presence of trees in the streets of the residences. Although only 5% of

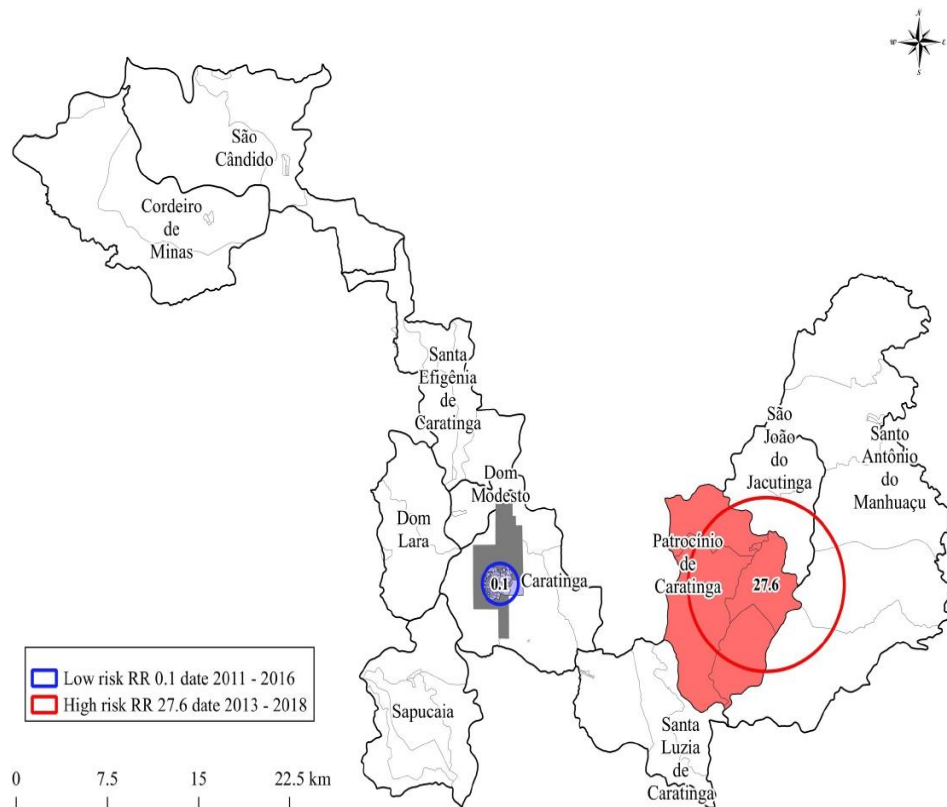


Fig 8. Relative risk of ATL cases reported in the city of Caratinga and in the district of Patrocínio de Caratinga ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.g008>

cases in the urban area can be explained by our spatial regression model, the presence of trees on the sidewalk showed statistical significance, which may indicate in neighborhoods with trees may have a higher incidence of ATL in the urban area. This same variable was not

Table 4. Ordinary Least Squares (OLS) Regression of leishmaniasis incidence rates by census sector in Caratinga area (all districts).

Variables	Coefficient	t-Statistic	P	Log likelihood	AIC
Constant	-42.7349	-2.6108	0.010	-837.871	1,685.74
Waste disposal on vacant lots	8.5288	8.8905	0.001		
Income up to ½ minimum wage	1.2428	4.4292	0.001		
Trees in the street	0.2255	1.4531	0.148		
Residence without sewage collection	0.1717	1.0597	0.291		
	R2 adjusted		p-Value		
	0.561		F-statistic		
			p = 0.01		

\* Akaike information criterion.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.t004>



Table 5. Ordinary Least Squares (OLS) Regression of leishmaniasis incidence rates in the urban area of Caratinga.

Variables	Coefficient	t-Statistic	P	Log likelihood	AIC'
Constant	2.3781	0.4093	0.68321	-420,365	850,739
Waste disposal on vacant lots	-0.1780	-0,1026	0.9184		
Income up to ½ minimum wage	0.0566	2,0549	0.62		
Trees in street	0.1095	2,0549	0.042		
Residence without sewage collection	0.0931	1,4009	0.164		
	R2 adjusted		p-Value		
	0.052098		F-statistic		
			p = 0.01		

\* Akaike information criterion.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.t005>

statistically significant when comparing the entire municipality. The comprehension of such factors may be useful to explain the transmission patterns of ATL in countryside municipalities and their understanding could be helpful for the improvement of public policies regarding disease control. However, it is worth mentioning that the data used to make such analysed were obtained from the demographic census of the IBGE [45], carried out in 2010, which implies the difficulty of relating other variables to the real situation of ATL in the municipality.

This study identified the phlebotomine sand fly fauna in the urban areas of the city of Caratinga and the districts of Patrocínio de Caratinga and Sapucaia. In the municipality of Caratinga, and in the other areas assessed, ATL cases and environmental impacts have historically been related to human occupation processes. The presence of the phlebotomine sand flies species found confirms the ability of these insects to adapt to environments different from their natural habitats [68,69]. It is important to relate the vector density to environmental aspects favorable to peridomestic sand flies, such as the presence of vegetation, roots, tree trunks and organic material, which are the possible shelters and breeding sites [70].

In the locations where the samples were collected, except for the center of Caratinga, there are mainly simple households, with poor basic sanitation and a large population of domestic animals. These conditions were more evident in Patrocínio de Caratinga and Sapucaia, where a high frequency of sand flies captured was found compared to some neighborhoods in Caratinga. In these neighborhoods, families kept different types of livestock outside the home as a means of subsistence. It is known that these factors associated with the low economic condition of residents contribute considerably to the transmission of ATL [71]. Here, a total of 113

Table 6. Sandflies collected by sex and location in the urban area of Caratinga, Patrocínio de Caratinga and Sapucaia in July and September 2020.

Species	Caratinga								Patrocínio de Caratinga		Sapucaia		Total (%)		
	Anápolis		Esplanada		Downtown		Limociro		Center		Center		♀	♂	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂			
<i>Evandromyia complexo cortezii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2 (100)	0 (0.00)	2 (1.77)
<i>Migonemyia migonei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2 (66.67)	1 (33.33)	3 (2.65)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1	1	1	2	0	0	0	0	3	4	1	2	6 (40.00)	9 (60.00)	15 (13.27)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	8	9	14	10	0	0	7	7	8	9	12	9	49 (52.69)	44 (47.31)	93 (82.30)
Total (%)	9	10	15	12	0	0	7	7	12	13	16	12	59 (52.21)	54 (47.79)	113 (100)
	19 (16.81)		27 (23.89)		0 (0.00)		14 (12.39)		25 (22.12)		28 (24.78)				113 (100)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009429.t006>

sand flies were captured and the most abundant species found was *Ny. whitmani* (82.30%), a proven vector of *L. braziliensis*. In some regions of Brazil this species is not yet urbanized or is in the process of urbanization, while in other regions the species is well adapted to the urban environment, as reported elsewhere [72]. The identification of the natural infection rates of sand flies by *Leishmania* is essential to determine the risk of infection for the hosts of an area, allowing adequate planning in the prevention and control of ATL. The finding of this species in all three areas with ATL patients led us to perform molecular prospection of *Leishmania* parasites in those sand fly vectors. Several epidemiological studies have assessed *Leishmania* infection in sand flies [73–77]. In those studies, the frequency of infection ranged from 0.4% [76] to 39.6% [78]. Here, different from those studies, we did not detect infection by *Leishmania* species, and this may be a result of the low number of collected insects since natural infection is expected to be very scarce [76]. However, since our captures occurred in urban areas closely related to human ATL cases, the presence of proven vectors is a strong indication of disease transmission in Caratinga, Patrocínio de Caratinga and Sapucaia districts [79–81].

The analyses performed in this study to investigate the spatial and temporal distribution of ATL in Caratinga must be interpreted considering the possible limitations imposed using data collected under passive surveillance. Spatial analysis was carried out based on secondary data, leading to studies of epidemiological factors that may present bias. It is known that an important bias that occurs in this type of study is underreporting, potentially due to diagnostic errors, inadequate medical records, failure of the sick person to seek medical attention or even a deficiency in the local surveillance system. The use of other variables such as demographic data associated with secondary data can minimize or eliminate bias in underreporting.

We do not know in which extent the discontinuity of the reference center services could have impacted the increase in the number of cases in the past two decades. However, we could not discharge the possibility that a myriad of factors may be contributing for this including environmental changes, access to health services and lack of knowledge on leishmaniasis. However, this study demonstrated that it is possible to provide, in retrospect, an overview of epidemiological patterns in the municipality using notification data, emphasizing the importance of passive research as a tool for the management of the ATL control program.

This is a multidisciplinary study using either GIS and sand fly assessment in the municipality of Caratinga. In conclusion, ATL cases are increasingly reported during the surveyed period not only in the rural (Sapucaia and Patrocínio de Caratinga districts) but also in two urbanized areas of Caratinga. Although we could not detect *Leishmania* in the sand flies, the presence of four proven ATL vectors overlapping with human cases strongly suggests that those areas are at risk of transmission and should undergo surveillance by the health authorities. Altogether those data confirmed the urbanization of ATL in Caratinga.

### Acknowledgments

To Jacqueline Marli dos Santos and Cicera Dulce Salgado from the Caratinga Public Health Services and the director of the Department of Epidemiological Surveillance José Calos Damasceno for providing ATL records helping us to get geographic data from notifications and the health agent Everaldo Alberto Oliveira for help during sand fly collections. We also thank the Print-Capes Program.

### Author Contributions

**Conceptualization:** Célia M. F. Gontijo, David S. Barbosa, Rodrigo P. Soares.

**Formal analysis:** Rafael L. Neves, Diogo T. Cardoso, Felipe D. Régo, Célia M. F. Gontijo, David S. Barbosa, Rodrigo P. Soares.

**Investigation:** Rafael L. Neves, Diogo T. Cardoso, Felipe D. Rêgo, Célia M. F. Gontijo, David S. Barbosa, Rodrigo P. Soares.

**Methodology:** Diogo T. Cardoso, Felipe D. Rêgo, David S. Barbosa.

**Supervision:** Célia M. F. Gontijo, Rodrigo P. Soares.

**Writing – original draft:** Rafael L. Neves, Rodrigo P. Soares.

**Writing – review & editing:** Diogo T. Cardoso, Felipe D. Rêgo, Célia M. F. Gontijo, David S. Barbosa.

## References

1. Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 1979; 73(2): 123–37. <https://doi.org/10.1080/00034983.1979.11687239> PMID: 315210
2. Mayrink W, Mendonça-Mendes A, Paula JC, Siqueira LMV, Marrocos SR, Dias ES, et al. Cluster randomized trial to evaluate the effectiveness of a vaccine against cutaneous leishmaniasis in the Caratinga microregion, south-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013; 107(4): 212–219. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt006> PMID: 23423433
3. Dias M, Mayrink W, Deane LM, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, et al. Epidemiology of mucocutaneous leishmaniasis Americana. I. Study of reservoirs in an endemic region of the State of Minas Gerais. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1977; 19(6): 403–10. PMID: 565946
4. Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, et al. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979; 73(4): 385–7. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90159-7) PMID: 555064
5. Magalhães PA, Mayrink W, Costa CA, Melo MN, Dias M, Batista SM, et al. Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1980; 22(4): 197–202. PMID: 7209275
6. Mayrink W, Melo MN, da Costa CA, Magalhães PA, Dias M, Coelho MV, et al. Intradermorreação de Montenegro na leishmaniose tegumentar americana após terapêutica antimonial. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1976; 18: 182–85. PMID: 951561
7. Melo MN, Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Dias M, Williams P, et al. Padronização do antígeno de Montenegro. *Ver Inst Med Trop São Paulo*. 1977; 19: 161–64.
8. Mayrink W, Magalhães PA, Dias M, da Costa CA, Melo MN, Lima AO. Responses to Montenegro antigen after immunization with killed *Leishmania* promastigotes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978; 72(6): 676. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90041-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90041-x) PMID: 734735
9. Antunes CM, Mayrink W, Magalhães PA, Costa CA, Melo MN, Dias M, et al. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Epidemiol*. 1986; 15(4): 572–80. <https://doi.org/10.1093/ije/15.4.572> PMID: 3546170
10. Mayrink W, Williams P, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, et al. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 1985; 79(3): 256–69. <https://doi.org/10.1080/00034983.1985.11811917> PMID: 4026438
11. Ogg MM, Carrion R Jr, Botelho AC, Mayrink W, Correa-Oliveira R, Patterson JL. Short report: quantification of leishmanivirus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 69(3): 309–313. PMID: 14628949
12. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzant G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*. 2011; 331(6018): 775–778. <https://doi.org/10.1126/science.1199326> PMID: 21311023
13. Silva SO, Wu AA, Evans DA, Vieira LQ, Melo MN. *Leishmania* sp. Isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as *Leishmania major*-like. *Acta Trop*. 2009; 112(3): 239–48. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.026> PMID: 19660430
14. Guimarães AC, Nogueira PM, Silva SO, Sadlova J, Pruzinova K, Hlavacova J, et al. Lower galactosylation levels of the Lipophosphoglycan from *Leishmania (Leishmania) major*-like strains affect interaction with *Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113(5): e170333. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170333> PMID: 29513819

15. Nogueira PM, Guimarães AC, Assis RR, Sadlova J, Myskova J, Pruzinova K, et al. Lipophosphoglycan polymorphisms do not affect *Leishmania amazonensis* development in permissive vectors *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit Vectors*. 2017; 10: 608. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2568-8> PMID: 29246180
16. Schallig HD, Silva ES, Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7(3): 387–93. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0651> PMID: 17767408
17. Marcelino AP, Ferreira EC, Avendanha JS, Costa CF, Chiarelli D, Almeida G, et al. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*. 2011; 183(1–2): 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.06.019> PMID: 21767914
18. Duncan M, Deane J, White PD, Ridge D, Roylance R, Korszun A, et al. A survey to determine usual care after cancer treatment within the United Kingdom national health service. *BMC Cancer*. 2017; 17(1): 186. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3172-1> PMID: 28284185
19. Banerjee S. Spatial Data Analysis. *Annu Rev Public Health*. 2016; 37: 47–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-032315-021711> PMID: 26789381
20. Yeshiwondim AK, Gopal S, Hailiemariam AT, Dengela DO, Patel HP. Spatial analysis of malaria incidence at the village level in areas with unstable transmission in Ethiopia. *Int J Health Geogr*. 2009; 8: 5. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-8-5> PMID: 19171051
21. Núñez-González S, Gault C, Simancas-Racines D. Spatial analysis of dengue, cysticercosis and Chagas disease mortality in Ecuador, 2011–2016. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2019; 113(1): 44–47. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try106> PMID: 30295901
22. Marchi MNA, Caldart ET, Martins FDC, Freire RL. Spatial analysis of leishmaniasis in Brazil: a systematized review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019; 61: e68. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961068> PMID: 31859845
23. Nasser JT, Donalisio MR, Vasconcelos CH. Spatial distribution of American Tegumentary leishmaniasis cases in Campinas, State of São Paulo, between 1992 and 2003. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42(3): 309–314. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822009000300013> PMID: 19684980
24. Melo HA, Rossoni DF, Teodoro U. Spatial distribution of cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná, Brazil. *PLoS One*. 2017; 12(9): e0185401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185401> PMID: 28938013
25. Souza VA, Cortez LR, Dias RA, Amaku M, Neto JSF, Kuroda RBS, et al. Space-time cluster analysis of American visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo State, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2012; 28(10): 1949–1964. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2012001000013> PMID: 23090174
26. Vieira CP, Oliveira AM, Rodas LA, Dibo MR, Guirado MM, Chiaravalloti Neto F. Temporal, spatial and spatiotemporal analysis of the occurrence of visceral leishmaniasis in humans in the City of Birigui, State of São Paulo, from 1999 to 2012. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47(3): 350–358. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0047-2014> PMID: 25075487
27. Gonçalves NV, Miranda CSC, Costa RJF, Guedes JA, Matsumura ESS, Costa SBN, et al. Cutaneous leishmaniasis: Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará, Brazilian Eastern Amazon. *J Infect Dev Ctries*. 2019; 13(10): 939–44. <https://doi.org/10.3855/jidc.11573> PMID: 32084026
28. Barbosa DS, Belo VS, Rangel ME, Werneck GL. Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. *Acta Trop*. 2014; 131: 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.002> PMID: 24342506
29. Fonseca ES, D'Andrea LA, Taniguchi HH, Hiramoto RM, Tolezano JE, Guimarães RB. Spatial epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in a municipality of west São Paulo State, Brazil. *J Vector Borne Dis*. 2014; 51(4): 271–275. PMID: 25540957
30. Maia-Elkhoury AN, Yadón ZE, Díaz MIS, Lucena FFA, Castellanos LG, Vazquez MJS. Exploring Spatial and Temporal Distribution of Cutaneous Leishmaniasis in the Americas, 2001–2011. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(11): e0005086. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005086> PMID: 27824881
31. Confalonieri UE, Margonari C, Quintão AF. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Trop*. 2013; 129: 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.09.013> PMID: 24056199
32. Gil JF, Nasser JR, Cajal SP, Juarez M, Acosta N, Cimino RO, Diosque P, Krolewiecki AJ. Urban transmission of American cutaneous leishmaniasis in Argentina: spatial analysis study. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 82(3): 433–440. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0113> PMID: 20207869

33. Salomón OD, Sosa-Estani S, Ramos K, Orellano PW, Sanguesa G, Fernández G, et al. Tegumentary leishmaniasis outbreak in Bella Vista City, Corrientes, Argentina during 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(7): 767–74. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000700010> PMID: 17160285
34. Melchior LAK, Brilhante AF, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and temporal distribution of American cutaneous leishmaniasis in Acre state, Brazil. *Infect Dis Poverty*. 2017; 6(1): 99. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0311-5> PMID: 28587683
35. Cardoso DT, de Souza DC, de Castro VN, Geiger SM, Barbosa DS. Identification of priority areas for surveillance of cutaneous leishmaniasis using spatial analysis approaches in Southeastern Brazil. *BMC Infect Dis*. 2019; 19(1): 318. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3940-4> PMID: 30975100
36. Ferreira FF, Duca de Freitas MB, Szinwelski N, Vicente N, Medeiros LCC, Schaefer CEGR, et al. Impacts of the Samarco tailing dam collapse on metals and arsenic concentration in freshwater fish muscle from Doce River, southeastern Brazil. *Integr Environ Assess Manag*. 2020; 10.1002/ieam.4289. <https://doi.org/10.1002/ieam.4289> PMID: 32470204
37. Queiroz HM, Nóbrega GN, Ferreira TO, Almeida LS, Romero TB, Santaella ST, et al. The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination?. *Sci Total Environ*. 2018; 637–638: 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.370> PMID: 29754084
38. Pinto MOKM Oliveira TM, Aguiar ANA Pinto PEM, Barbosa DS Diniz SA, et al. Profile of American Tegumentary Leishmaniasis in transmission areas in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2007 to 2017. *BMC Infect Dis*. 2020; 20(1): 163. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4860-z> PMID: 32087701
39. Yuill RS. The Standard Deviation Ellipse: An Updated Tool for Spatial Description. *Geografiska Annaler. Series B, Human Geography*. 1971; 53(1): 28–39. <https://doi.org/10.2307/490885>
40. Bailey T, Gatrell A. *Interactive Spatial Data Analysis*. London: Longman Scientific and Technical; 1995.
41. Pellegrini A, Kulldorff M. SaTScan—Manual do Usuário para versão 9.4. 2016.
42. Kulldorff M. SaTScan—Software for the spatial, temporal, and spacetime scan statistics. Boston; 2016.
43. Abrams AM, Kleinman KP. SaTScan macro accessory for cartography (SMAC) package implemented with SAS software. *Int J Health Geogr*. 2007; 6: 6. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-6-6> PMID: 17341310
44. Cohen J, Cohen P, West S, Aiken L. *Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 2003.
45. IBGE—Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010. Available from: <https://censo2010.ibge.gov.br/>. Accessed 29 March 2020.
46. Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2005; 38(1): 70–72. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822005000100017> PMID: 15717102
47. el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schöniang 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. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90093-2](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90093-2) PMID: 11132393
48. Schöniang G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47(1): 349–58. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(03)00093-2) PMID: 12967749
49. Oliart-Guzmán H, Martins AC, Mantovani SAS, Braña AM, Delfino BM, Pereira TM, et al. Epidemiological profile of American cutaneous leishmaniasis in the amazonian frontier: a retrospective study in Assis Brasil, Acre, Brazil. *Rev Patol Trop*. 2013; 42(2): 187–200. <https://doi.org/10.5216/rpt.v42i2.25522>
50. Rojas CA, Weigle KA, Barrera L, Collazos C. Surveillance and screening of American cutaneous leishmaniasis by Colombian primary health care workers using a clinical prediction rule. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96(4): 405–10. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90375-5](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90375-5) PMID: 12497977
51. Seneviratne SL, Gunatillake SB, Silva HJ. Reporting notifiable diseases: methods for improvement, attitudes and community outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997; 91(2): 135–37. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(97\)90199-1](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(97)90199-1) PMID: 9196750
52. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004; 27(5): 305–18. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004> PMID: 15225981
53. World Health Organization. Control of the leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: World Health Organization; 2010. Available from: [http://apps.who.int/ins/bitstream/10665/44412/1/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://apps.who.int/ins/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf). Accessed 01 April 2010.
54. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*. 2012; 7(5): e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> PMID: 22693548

55. Yadón ZE, Quigley MA, Davies CR, Rodrigues LC, Segura EL. Assessment of leishmaniasis notification system in Santiago del Estero, Argentina, 1990–1993. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(1): 27–30. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.27> PMID: 11504403
56. Gonçalves AFLS Lima SS, Silva APSC Barbosa CC. Spatial dynamics and socioeconomic factors correlated with American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil from 2008 to 2017. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020; 53: e20190373. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0373-2019> PMID: 32348432
57. VN Dias ÁFLR, Sousa VRF. Epidemiological aspects of Leishmaniasis in the Pantanal region of Mato Grosso. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2019; 28(4):744–749. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019061> PMID: 31800884
58. Detoni MB, L DM, Silva TP, Machado LF, Tomiotto-Pellissier F, Costa IN, et al. Temporal and spatial distribution of American Tegumentary Leishmaniasis in north Paraná: 2010–2015. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019; 52: e20180119. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0119-2018> PMID: 30785532
59. Teixeira-Neto RG, da Silva ES, Nascimento RA, Belo VS, de Oliveira CD, Pinheiro LC, et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. *Parasit Vectors.* 2014; 7: 485. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0485-7> PMID: 25326767
60. Menezes JA, Ferreira C, Andrade-Filho JD, Alessandra MS, Morais MHG, Rocha AMS, et al. An Integrated Approach Using Spatial Analysis to Study the Risk Factors for Leishmaniasis in Area of Recent Transmission. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 621854. <https://doi.org/10.1155/2015/621854> PMID: 26229961
61. Margonari C, Menezes JA, Rocha MN, Maia KN, Oliveira ME, Fonseca AL, et al. Public Knowledge about and Detection of Canine Visceral Leishmaniasis in Urban Divinópolis, Brazil. *J Trop Med.* 2012; 2012: 429586. <https://doi.org/10.1155/2012/429586> PMID: 22991521
62. França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2003; 111(2–3): 161–173. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00351-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00351-5) PMID: 12531292
63. Rocha ATF, Espindola GM, Soares MRA, Rocha JRS, Costa CHN. Visceral leishmaniasis and vulnerability conditions in an endemic urban area of Northeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2018; 112(7): 317–325. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try058> PMID: 30053165
64. Andrade IM, Santana GMS, Sacramento RVO. Geoprocessing health: A study on American Tegumentary Leishmaniasis in Vale of Jiquiriçá, Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde-Hygeia.* 2014; 10(18): 1–13.
65. Silva NS, Viana AB, Cordeiro JA, Cavasini CE. American cutaneous leishmaniasis in the State of Acre, Brazil. *Rev Saude Publica.* 1999; 33(6): 554–9. <https://doi.org/10.1590/s0034-89101999000600006> PMID: 10689371
66. Silva NS, Muniz VD. Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in the State of Acre, Brazilian Amazon. *Cad Saude Pública.* 2009; 25(6): 1325–36. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x200900600015> PMID: 19503963
67. Buzanovsky LP, Sanchez-Vazquez MJ, Maia-Elkhoury ANS, Werneck GL. Major environmental and socioeconomic determinants of cutaneous leishmaniasis in Brazil—a systematic literature review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020; 53: e20190291. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0291-2019> PMID: 32491100
68. Almeida OS, Minzão ER, Minzão LD, Silva SR, Ferreira AD, Faccenda O, et al. Ecological aspects of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Ponta Porã municipality, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43(6): 723–7. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822010000600025> PMID: 21181032
69. Guimarães VCF Costa PL, Silva FJ Silva, KT Silva KG, Araújo Alf, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. *Rec Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(1): 66–70. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822012000100013> PMID: 22370831
70. Camargo-Neves VL, Katz G, Rodas LA, Poletto DW, Lage LC, Spinola RM, et al. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998–1999. *Cad Saude Publica.* 2001; 17(5): 1263–7. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2001000500026> PMID: 11679900
71. Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, et al. Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 3(5): 421–5. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822005000500012> PMID: 16172760
72. Vieira VR, Azevedo ACR, Alves JRC, Guimarães AE, Aguiar GM. Ecological Aspects of Phlebotomine Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Areas of American Cutaneous Leishmaniasis, in

- the Municipality of Paraty, Rio de Janeiro, Brazil. I-Index of Abundance by Location and Type of Capture. *J Med Entomol*. 2015; 52(5): 886–95. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv105> PMID: 26336245
73. Miranda JC, Reis A, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, et al. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pin-point capture and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(2): 185–8. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000200006> PMID: 12016439
  74. Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcao AL, Lima ACVMP, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008; 8(3): 407–14. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0180> PMID: 18429695
  75. Lopes JC, Michalsky EM, Pereira NCL, Paula AJV, Lara-Silva FO, Silva-Lana R, et al. Entomological Studies in Itaúna, Brazil, an Area With Visceral *Leishmaniasis* Transmission: Fauna Survey, Natural *Leishmania* Infection, and Molecular Characterization of the Species Circulating in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 2019; 56(5): 1368–1376. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz061> PMID: 31121044
  76. Lara-Silva FO, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Fiuzza VOP, Pessanha JEM, Regina-Silva S, et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop*. 2015; 148: 128–36. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.002> PMID: 25882769
  77. Lana RS, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Lara-Silva FO, Lima ACVMP, et al. Phlebotomine sand fly fauna and leishmania infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a natural Brazilian heritage site. *Boimed Res Int*. 2015; 385493. <https://doi.org/10.1155/2015/385493> PMID: 25793193
  78. Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol*. 2010; 47(6): 1212–9. <https://doi.org/10.1603/me09248> PMID: 21175074
  79. Michalsky EM, Guedes KS, Silva FOL, França-Silva JC, Dias CLF, Barata RA, et al. Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44(1): 58–62. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822011000100014> PMID: 21340410
  80. Rêgo FD, Rugani JMN, Shimabukuro PHF, Tonelli GB, Quaresma PF, Gontijo CMF. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. 2015; 10(4): e0122038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122038> PMID: 25853254
  81. Ávila MM, Brilhante AF, Souza CF, Bevilacqua PD Galati EAB, Brazil RP. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. *Parasit Vectors*. 2018; 11(1): 64. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2641-y> PMID: 29373995

**Anexo 2 – Artigo 2 – Neves *et al.*, submetido. Increased risk of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) in an urban and rural of Caratinga, Brazil between 2007 - 2021.**

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene



**Increased risk of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) in an urban and rural area of Caratinga, Brazil between 2007-2021**

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine &amp; Hygiene</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Neves, Rafael Luiz; Oswaldo Cruz Foundation Rene Rachou Institute, Biotechnology Applied to the Study of Pathogens Ker, Fabrício Thomaz; Federal University of Minas Gerais, Laboratory of Epidemiology of Infectious and Parasitic Diseases Rêgo, Felipe; Oswaldo Cruz Foundation Rene Rachou Institute, Biotechnology Applied to the Study of Pathogens Rugani, Jeronimo; Oswaldo Cruz Foundation Rene Rachou Institute, Biotechnology Applied to the Study of Pathogens Andrade Filho, José; Oswaldo Cruz Foundation Rene Rachou Institute, Biotechnology Applied to the Study of Pathogens Soares, Rodrigo; Oswaldo Cruz Foundation Rene Rachou Institute, Biotechnology Applied to the Study of Pathogens Gontijo, Célia Maria; Oswaldo Cruz Foundation Rene Rachou Institute, Leishmaniasis Study Group
Key Words:	Leishmaniasis, Spatial Analyses, Urbanization, <i>Leishmania braziliensis</i> , Psychodidae

SCHOLARONE™  
Manuscripts



1                   Increased risk of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) in an  
2                   urban and rural area of Caratinga, Brazil between 2007-2021

3  
4                   Rafael L. Neves,<sup>1,\*</sup> Fabrício T. O. Ker,<sup>2,†</sup> Felipe D. Rêgo,<sup>1</sup> Jeronimo M. N. Rugani,<sup>1</sup>  
5                   José D. Andrade Filho,<sup>1</sup> Rodrigo P. Soares,<sup>1</sup> Célia M. F. Gontijo,<sup>1</sup>

6                   † These authors contributed equally to this work.

7  
8                   <sup>1</sup>René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais,  
9                   Brazil; <sup>2</sup>Laboratory of Epidemiology of Infectious and Parasitic Diseases, Institute of  
10                  Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais,  
11                  Brazil

12  
13                  *Abstract.* We used spatial analysis tools to examine the epidemiological situation and  
14                  spatial distribution of American Tegumentary Leishmaniasis in the municipality of Caratinga  
15                  between 2007-2021. In addition, potential sand fly vectors were captured. All information used  
16                  in this study was retrieved from public health archives and confirmed in the State Health  
17                  Services databases. All cases were analyzed using Geographic Information Systems software.  
18                  In addition, sand fly collections and molecular detection of *Leishmania* were carried out in areas  
19                  with the highest number of cases. During the analyzed period, ATL cases increased and  
20                  remained high in the last years. The hotspots included urban areas of Caratinga city and the  
21                  districts of Patrocínio of Caratinga and Sapucaia. The species *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia*  
22                  *intermedia* and *Migonemyia migonei* were the most abundant species and the ITS1-PCR  
23                  technique detected *Leishmania* DNA in these species. Based on our analyses, the urbanization  
24                  of ATL in Caratinga has taken place in recent years. Due to the increase in the number of human  
25                  cases and the presence of vectors, it is recommended that health authorities focus on control  
26                  measures in hotspots.

27  
28                  Cutaneous Leishmaniasis; Spatial Analyses; urbanization, *Leishmania braziliensis*;  
29                  Psychodidae.

30  
31                  \* Address correspondence to Rafael L. S. Neves, E-mail: [rafaelluizneves@hotmail.com](mailto:rafaelluizneves@hotmail.com) or Rodrigo P. Soares,  
32                  Biotechnology Applied to the Study of Pathogens, René Rachou Institute, Fiocruz Minas, Minas Gerais, Brazil,  
33                  E-mail: [rodrigosoares28@hotmail.com](mailto:rodrigosoares28@hotmail.com).

34

35

36

## INTRODUCTION

37 Visceral (VL) and tegumentary Leishmaniasis are considered reemerging diseases  
38 depending on the epidemiological scenarios.<sup>1</sup> They are an important public health problem and  
39 a challenge for health services in endemic regions worldwide. In Brazil, a wide spectrum of  
40 epidemiological aspects, clinical manifestations and severity are a challenge for treatment and  
41 control.<sup>2</sup> Environmental changes also have an impact in disease transmission affecting the  
42 relationship between exposed populations and ecological features.<sup>3</sup> In this context, American  
43 Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an example of zoonoses related to land use and  
44 biodiversity management and often related to occupational exposure.<sup>4</sup> During the last decades  
45 the phenomenon of VL urbanization has been increasingly reported in several cities of the  
46 world, especially in Brazil.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> This is a result of the adaptation of the main vector  
47 *Lutzomyia longipalpis* in the urban areas.<sup>11,12</sup> However, the epidemiological aspects of ATL  
48 transmission are much more complex depending on the *Leishmania* species, vectors'  
49 adaptability, and ecological situations. Although most studies have shown a correlation between  
50 gender and occupational exposure in several countries,<sup>13,14</sup> this characteristic may not be clear  
51 in others.<sup>13</sup>

52 The municipality of Caratinga, located in Vale do Rio Doce, east of the State of Minas  
53 Gerais, Brazil, is a municipality with urban characteristics surrounded by a vast rural area of  
54 coffee cultivation. For this reason, a high number of ATL cases are reported mainly in  
55 occupationally exposed rural workers. The main species captured in these endemic areas are  
56 the proven vectors for ATL represented by *Nyssomyia whitmani* and *Migonemyia migonei*. This  
57 region is an important ATL focus in Brazil comprising one of the five microregions affected in  
58 the Minas Gerais state.<sup>15,16</sup> Studies published in the 1970s<sup>17,18</sup> and in 2021<sup>19</sup> show that the  
59 municipality is an important place of rural transmission, even with the occurrence of urban

60 cases of ATL by *Leishmania braziliensis*. This finding is of epidemiological relevance since  
61 the urbanization of ATL is less common than VL.

62 Before 2018, analyzes showed the presence of hotspots of human cases in the northern and  
63 southwestern parts of Caratinga city. An entomological survey found proven ATL vectors,  
64 whose presence was associated with side-walk trees and vacant lots.<sup>19</sup> In general, ATL  
65 transmission is affected by environmental degradation, work activities, vector proliferation and  
66 proximity to water bodies. Although human cases were evident, no sand flies infected by  
67 *Leishmania* were found.<sup>19,20</sup>

68 To confirm our previous observations on ATL urbanization in Caratinga after 2018 we  
69 followed this area from 2019 to 2021 using Geographic Information Systems (GIS) approaches  
70 and spatial analysis methods. These tools are very helpful and were already carried out in  
71 several countries in Latin America and Amazon region.<sup>4,13,14,21</sup> Additionally, we provide a  
72 systematic sand fly collection between 2020-2021 in the urban and rural areas of the  
73 municipality with molecular detection of *Leishmania*. Our objective was to ascertain the level  
74 of urbanization and rural expansion of ATL in the last fifteen years.

## 75 MATERIALS AND METHODS

76 **Study area.** The study was carried out in the municipality of Caratinga (19° 47' 25" S and  
77 42° 8' 21" W), Minas Gerais State, Brazil. The municipality occupies an area of 1,258.479 km<sup>2</sup>,  
78 with 15.9 km<sup>2</sup> of urban perimeter, with an estimated population in 2021, according to data from  
79 the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) of 93,124 inhabitants and a  
80 population density of the last census of 67,72 inhabitants/km<sup>2</sup> (IBGE, 2022). In the Gross  
81 Domestic Product (US\$ 3,743.27), the areas of industry and services stand out, but agriculture  
82 and livestock also represent a relevant participation, mainly with the production of coffee.  
83 Caratinga comprises ten districts including: Cordeiro de Minas, Dom Lara, Dom Modesto,

84 Patrocínio de Caratinga, Santa Efigênia de Caratinga, Santa Luzia de Caratinga, Santo Antônio  
85 do Manhuaçu, Sapucaia, São Cândido and São João Jacutinga (Figure 1).<sup>22</sup>

86 **Ethical aspects, data collection and spatial analysis.** The collection of biological samples  
87 in individuals was performed under the approval of Research Ethics Committee of the René  
88 Rachou Institute – Fiocruz Minas (#3.997.721). Identification of patients was kept confidential,  
89 and no specific ethical considerations were required. Two types of analysis were performed.  
90 First, the number of ATL cases was evaluated based on the data from the State Health  
91 Department from January 2019 to December 2021. Second, those data were subjected to spatial  
92 analysis in comparison to those between 2007-2018.<sup>19</sup>

93 **Strategy for data analysis.** Data were analyzed using the same methodology as reported  
94 elsewhere<sup>19</sup> with modifications. Briefly, Bayesian analysis was used to estimate incidence rates  
95 for each three-year period using Bayesian Empirical Spatial.<sup>16</sup> This analysis used GeoDa  
96 software version 1.14 (ASU, GeoDa Center for Geospatial Analysis and Computation, Arizona,  
97 USA). Standard Deviational Ellipses were used to synthesize the characteristics of the  
98 geographic features (urban and rural) allowing directional trends of the ATL epidemic sectors  
99 clusters by triennium.<sup>23,24</sup> To identify hot areas for ATL, Kernel density spatial analysis tool  
100 was used to calculate the magnitude and adjust the distribution and abundance of ATL cases.  
101 The density of the maps of the trienniums were standardized in categories. Areas with density  
102 greater than zero ( $>0$ ) were successively overlapped to assess the development of the affected  
103 area and the number of positive trienniums in it. ArcMap 10.6.1<sup>25</sup> was used for determining  
104 Standard Deviational Ellipses and Kernel density. Finally, the relative risk (RR) technique was  
105 used, spatio-temporal scanning techniques configured to detect areas of high and low risk for  
106 ATL transmission. For this technique, the SaTScan 9.4.4 software was used.<sup>26</sup>

107 **Sand fly captures.** Entomological collections were performed in the municipality of  
108 Caratinga (Figure 2a), under a permanent license for the collection of zoological material

109 (SISBio #15237-2). Captures with HP light traps<sup>27</sup> occurred during in the years 2020 and 2021  
110 during the months of January, March, May, July, September and November. In 2020, 20  
111 collection points (P1-P20) were selected in the Córrego Volta Grande area in the Patrocínio de  
112 Caratinga district (Figure 2b). In 2021, a total of ten sampling points were selected, six (U1-  
113 U6) in the urban area of Caratinga: Anápolis and Esplanada neighborhoods (two traps each),  
114 Centro and Limoeiro (one trap each) (Figure 2c), and four sampling points in the transitional  
115 area of the district of Sapucaia (T1-T4) (Figure 2d). These areas were chosen based on the  
116 highest number of reported cases of ATL. The insects were stored in glycerin alcohol before  
117 identification and molecular approaches.

118 **Diversity, similarity, and hotspot assessment.** To evaluate sand fly fauna, species  
119 diversity indices were calculated for each point and for each district. Those included: taxa  
120 richness (S), individual abundance (N), dominance (D), Simpson (1-D), Shannon-Weiner (H),  
121 equitability (J) and Margalef. H and 1-D index were compared between pairs of districts with  
122 the t test for Diversity. The similarity between the districts was evaluated using the Jaccard  
123 Index,<sup>28</sup> and the similarity between the sampling points was evaluated using the hierarchical  
124 clustering for the same index. To calculate the magnitude and adjust the distribution and  
125 abundance of ATL cases, vectors, and infected pools of ten insects were subjected to Kernel  
126 analysis as reported above.

127 **Vectors and factors associated with human cases.** The probability associated with the  
128 occurrence of ATL cases (2007-2021) was estimated in relation to vector collections between  
129 2020-2021. Although data on sand fly collection before 2020 was not available, this analysis  
130 helps to identify the hotspots by overlapping ATL cases and vectors during the entire period.  
131 Three different periods were assessed: 2007-2021 (all periods); 2007-2018 (period before  
132 collection); 2016-2018 (last triennium before collection) since other time periods were not  
133 significant. The outcome or dependent variable was dichotomized according to the presence of

134 ATL in 600 meters radius of each point (n=30) of vector collection: coded as 1 if the point had  
135 reported at least one case, or as 0 if none was confirmed. Variables related to district and place  
136 of collection were included in the analysis as independent or explanatory variables. Bayesian  
137 logistic regression, reporting Odds Ratio (OR) of occurrence of human cases of a given category  
138 in relation to the reference category, was calculated in the Stata Statistical Software.<sup>29</sup>

139 ***Leishmania* detection and typing.** *Leishmania* detection was performed in human samples  
140 and captured sand flies. The investigation of *Leishmania* in human samples was made from  
141 biopsies collected from cases referred to the Municipal Health Service during the period 2020  
142 and 2021. Parasite detection for human and sand fly's samples was targeted ITS1 (Internal  
143 Transcribed Spacer 1)<sup>30</sup> a region of rDNA of *Leishmania*. Phlebotomine were tested with a  
144 minimum of one sand fly female specimen or pooled to a maximum of ten female specimens  
145 of the same species, date and place of collection. Negative control groups used male sand flies.  
146 Positive controls with 20 nanograms of DNA extracted from reference strains of *L. amazonensis*  
147 (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum*  
148 (MHOM/BR/74/PP75), *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) and *L. major*  
149 (MHOM/IL/81/Friedlin), were used. Positive samples were submitted to digestion by the  
150 restriction enzyme *Hae*III to identify *Leishmania* species.<sup>31</sup> Amplified PCR products were  
151 sequenced. Reactions were performed using BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing  
152 (Applied Biosystems Foster City, USA) following the manufacturer's specifications and  
153 assayed in the Sanger ABI 3730 Sequencing. Consensus sequences were obtained and edited  
154 using the software package Phred/Phrap/Consed version: 0.020425.c (University of  
155 Washington, Seattle, USA). The sequences were evaluated against NCBI database using  
156 BLASTn.<sup>32</sup>

157 **Identification of blood meal sources in blood-fed sand fly females.** The identification  
158 of blood gut-content of engorged sand fly females was conducted by PCR-based analysis of the

159 cytochrome B gene (CytB), using primers previously described,<sup>33</sup> followed by sequencing the  
160 383-bp product. The procedure was performed following the protocol described by Carvalho et  
161 al., (2017).<sup>34</sup> The reactions were prepared in 1x buffer with 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 10  
162 mM forward and reverse primers, 1 U/μl Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad,  
163 CA), and 5 μl of DNA template to the volume of 25 μl. The positive control for the PCR  
164 reactions consisted of DNA extracted from *Canis familiaris*, and male sand flies of the species  
165 *Nyssomyia whitmani*, obtained from the laboratory sample pool, were used as negative internal  
166 controls in all DNA extractions. The amplification products were electrophoresed on a 1.5%  
167 agarose gel stained with ethidium bromide (10 mg/ml) with a 100 bp DNA Step Ladder. The  
168 amplicons obtained were removed from the agarose gel under UV exposure and purified by a  
169 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). The samples were then sequenced  
170 with ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a final  
171 volume of 10 μl with ~50 ng of the purified PCR products and 3.3 pmol of the forward and  
172 reverse primers. FinchTV software (Geospiza Inc., Seattle, WA) was used to manually verify  
173 the electropherograms and SeqTrace software<sup>35</sup> was used to align and calculate consensus  
174 sequences for regions of similarity with GenBank sequences by the Basic Local Alignment  
175 Search Tool (BLAST). The identification of the extracted blood meal species was considered  
176 correct when the sequences showed more than 87% identity for at least 94% of the analyzed  
177 sequence.

178

## RESULTS

179 A total of 428 records were obtained from the health service, 319 in 2007-2018<sup>19</sup> and 109  
180 in the 2019-2021. Most ATL cases reported in the last three-year period were in males (64.22%)  
181 than females (35.78%). The average ages were 42 and 38, for men and women, respectively.  
182 Of the analyzed individuals, 24.77% had a low level of education. Cutaneous lesions were the  
183 most prevalent form of the disease (99.08%). ATL cases (71.55%) were concentrated in rural

184 areas throughout the municipality. It is interesting to observe that in the period from 2007 to  
185 2018 (12 years), 42 cases were registered in the urban area and 31 notifications only in the last  
186 three years (2019-2021) (Table 1).

187 The incidence rate in the period 2019-2021 varied. The lowest rate was observed in 2021  
188 (2.04) and the highest in 2020 (4.97). The incidence in the municipality of Caratinga during  
189 2019-2021 was 11.77 and the incidence since the historical series increased from 3.01 in 2007-  
190 2018<sup>19</sup> to 4.74 in 2007-2021 (Table 2).

191 After the peak of ATL cases in 2016-2018, the high number of cases was maintained in  
192 2019-2020, with a reduction in 2021. The first time in the historical series 2019-2021, the urban  
193 area of Caratinga contributed with a higher number of cases (25) than Patrocínio de Caratinga  
194 (21). The other districts contributed with a lower number of cases, with seven cases in Dom  
195 Modesto and Santa Efigênia (6.42%), four cases in São João do Jacutinga (3.67%), three cases  
196 in Cordeiro de Minas (2.75%) and, two cases in Dom Lara and São Cândido (1.83%) (Table 3).  
197 Except for Dom Lara and São Cândido, the other districts since 2013-2015 have registered a  
198 continuous increase in the number of cases<sup>19</sup>. Between 2007-2015, five districts did not present  
199 cases of ATL in at least one of the year period. In 2016-2018 there was only one district without  
200 cases. In the last triennium 2019-2021, all districts had cases (Table 3).

201 During the period of 2019-2021, the incidence rates of 255.1/10,000 inhabitants, were  
202 detected, with cases in all districts in comparison to the historical series. All census sectors of  
203 Dom Modesto and Patrocínio de Caratinga districts registered cases. The triennium 2019–2021  
204 had the highest number of census sectors with cases in rural and urban areas (Figure 3a and b)  
205 compared with the historical series.

206 Despite the cases being dispersed across the entire area, the ellipses show different spatial  
207 distribution among the triennium periods. Except for 2010–2012/2013–2015, which had similar  
208 ellipses distribution. The 2019–2021 ellipse is larger, with wider distribution of ATL cases in



209 all directions and a slight shift northward (Figure 4a). In the urban area (Figure 4b) it is observed  
210 that in the period 2010-2015 there was a slight increase in the amplitude of the ellipses followed  
211 by a decrease in 2016-2018. The 2019-2021 ellipse spanning part of the north/south axis.

212 Kernel density maps (2019–2021) showed the maintenance of several hotspots since 2007,  
213 Patrocínio de Caratinga, the urban area of Caratinga city and the district of Sapucaia (except  
214 for 2013 – 2015) (Figure 5a). In 2016–2018 there was a higher concentration of cases, reaching  
215 almost 40 cases. In 2019–2021 there was a reduction in the concentration of cases (up to 10  
216 cases). However, they comprised a higher number of hotspots and occupied a larger area  
217 (82km<sup>2</sup>, historical record, Table 4).

218 Complementing the information contained in the ellipses, Table 4 shows the area affected  
219 by the disease in each three-year period. Overlapping the five trienniums, we observe a total  
220 coverage area of 171 km<sup>2</sup> showing a territorial expansion of the disease. This pattern was also  
221 seen in the urban area of Caratinga city, whose number of cases expanded to the southwest  
222 (Figure 5b). In Figure 6, specific areas were observed within the districts of Patrocínio de  
223 Caratinga, Sapucaia, Santa Efigênia, with occurrences of four and five consecutive three-year  
224 periods with records of human cases of ATL. The situation is more critical in the urban area of  
225 Caratinga, where areas of high frequency of ATL occur in the Northeast, Center and South  
226 regions.

227 The analysis of relative risk (RR) was carried out in two periods, the first with data from  
228 the historical series from 2007-2018 and the second from 2007-2021. As seen in the results  
229 presented in Figure 7, two areas (low and high) of risk for ATL transmission were identified.  
230 The low risk, located in the urban area of Caratinga, with a relative risk of 0,051 in period one  
231 and 0,057 in period two (Figure 6b). The high risk covered the district of Patrocínio de  
232 Caratinga with 28,17 and 26,71, periods one and two respectively (Figure 6a).

233 A total of 13,043 sand fly specimens from seven genera and 11 species were collected,  
 234 7,547 females (57.86%) and 5,496 males (42.14%) including: 5,235 (40.14%) *Nyssomyia*  
 235 *whitmani*, 3,948 (30.27%) *Nyssomyia intermedia*, 3,078 (23.60%) *Migonemyia migonei*, 238  
 236 (1.82%) *Evandromyia lenti*, 218 (1.67%) *Pintomyia pessoai*, 153 (1.17%) *Micropygomyia*  
 237 *quinquefer*, 108 (0.83%) *Nyssomyia neivai*, 57 (0.44%) *Evandromyia cortelezzii*, 3 (0.02%)  
 238 *Brunptomomyia cunhai*, 3 (0.02%) *Sciopemyia microps* and 2 (~0.02%) *Micropygomyia capixaba*  
 239 (Table 5). Figure 8a shows the total density of sand flies collected throughout the period in the  
 240 studied areas. As shown, the species *Ny. whitmani* (Figure 8b), *Ny. intermedia* (Figure 8c) and  
 241 *Mg. migonei* (Figure 8d) were more abundant than other species collected (Figure 8e). The  
 242 density of sand flies was higher in Patrocínio de Caratinga and lower in Caratinga city.

243 Low species diversity was found in the urban area of Caratinga, represented by vectors as  
 244 shown by the high dominance (D) index, whereas the Simpson (1-D) and Shannon (H) indexes  
 245 were very low. In each Caratinga point, the richness varied between 2-10 species, and the  
 246 highest Shannon and Simpson indexes were 1.318 and 0.702 respectively (Table 6). In the urban  
 247 area of Caratinga, the H and 1-D diversity indices were lower than in the other locations. As  
 248 observed, the districts of Sapucaia and Patrocínio de Caratinga presented higher richness (S)  
 249 and abundance (N), and dominance (D) was low. Diversity indices were very similar between  
 250 areas, and higher than in the city of Caratinga, but still considered too low for the sampling  
 251 effort, corroborated by Margalef's indices. The equitability (J) was high in Sapucaia, and  
 252 median in the city of Caratinga and in the district of Patrocínio in Caratinga, indicating a slight  
 253 predominance of some species (Table 6).

254 The Jaccard Index showed low similarity between the evaluated areas, being 40% between  
 255 the city of Caratinga and Sapucaia, 30% between Sapucaia and Patrocínio de Caratinga and  
 256 only 20% between the city of Caratinga and Patrocínio de Caratinga. The hierarchical grouping  
 257 (Figure 9) showed a close relationship between the points of each district, pointing to distinct

258 clusters and arrangements of vector species communities in each environment. This analysis  
259 also showed the presence of three clusters, one in the city of Caratinga, urban area, the district  
260 of Sapucaia, transitional area, and Patrocínio de Caratinga, rural area (City of Caratinga U1 -  
261 U6; Sapucaia T7 - T10; Patrocínio de Caratinga P1 – P20).

262 To identify *Leishmania*, both sand flies and human samples were subjected to PCR. From  
263 the total of 13,043 specimens of sand flies collected, 1,054 pools were obtained, 936 in the  
264 collection carried out in the year 2020 and 118 in the year 2021. The sand fly collection carried  
265 out in 2020 in Patrocínio de Caratinga showed a total of 13 pools (~1.23%) positive for  
266 *Leishmania braziliensis*, belonging to *Ny. whitmani* (7), *Ny. intermedia* (4) and *Mg. migonei*  
267 (2). Positive pools were detected at points P3 (5), P4 (1), P10 (2), P12 (1), P13 (2), P16 (1) and  
268 P20 (1). None of the 118 pools collected in 2021 in the city of Caratinga and in the urban area  
269 of the district of Sapucaia were positive. Not all areas with high density of sand flies had high  
270 density for infected sandflies (Figure 8f).

271 During the period 2020-2021, 27 human biopsies were obtained from the Caratinga Health  
272 Service. Of this total, 19 men (~70%) and 8 women (~30%), belong, according to the records  
273 provided, to the rural area of the municipality and urban area of the city. In all samples, the  
274 species *Leishmania braziliensis* was identified.

275 The 383 bp of the CytB gene was amplified in 40 of the 7,547 females, belonging to *Ny.*  
276 *whitmani* (15), *Ny. intermedia* (14), *Mg. migonei* (10) and *Ev. lenti* (1). All these engorged  
277 females were collected in Patrocínio de Caratinga. The analyzes identified five vertebrate  
278 species in the samples (Table 7). *Homo sapiens* was the most common blood meal source in 16  
279 of the 40 samples analyzed. We emphasize that only *Ny. whitmani* presented catholic feeding  
280 habit, having its meal in all five identified vertebrate species.

281

## DISCUSSION

282 The municipality of Caratinga is an area where cases of ATL have been reported for several  
283 years. Nonetheless for two decades, since the early 2000s, studies on ATL in Caratinga have  
284 not been carried out. In 2021 a considerable study showed the transmission of the disease in the  
285 urban area of the city<sup>19</sup>. In this study, a spatial analysis of a historical series (2007-2018) was  
286 carried out, and sand flies were collected in the municipality in areas impacted by the disease.  
287 In conclusion, cases of ATL are increasingly reported not only in the rural area but also in the  
288 urban area of the city of Caratinga. Although it was not possible to detect *Leishmania* in sand  
289 flies, the presence of ATL vectors superimposed on human cases strongly suggests that these  
290 areas are at risk of transmission and should be monitored by health authorities. Taken together,  
291 these data confirmed the urbanization of the ATL in Caratinga. Here, we provide an update on  
292 this situation employing GIS analysis in the area in the period 2019-2021.

293 Despite the wide distribution of ATL in Brazil, most of the reported cases occur in states  
294 located mainly in the Brazilian Amazon, especially in the states of Amazonas, Maranhão, Mato  
295 Grosso, Pará and Rondônia.<sup>36,37,38</sup> However, previous studies carried out in the states of  
296 Pernambuco,<sup>39</sup> Paraná,<sup>40</sup> São Paulo<sup>3</sup>, Rio de Janeiro<sup>41</sup> and Minas Gerais,<sup>42,43</sup> showed that ATL  
297 is a predominantly rural disease. Males are generally the most vulnerable population. Our  
298 results corroborate those of Neves et al., 2021<sup>19</sup> showing that the localized cutaneous form is  
299 more prevalent (99.08%), and the use of medication is the main control measure. It is interesting  
300 to note that although most cases, both in the historical series and in the last three years, are of  
301 rural origin, an increase in the number of cases reported in the urban area can be observed in  
302 the last period evaluated.

303 During the entire period analyzed, there was a fluctuation in the number of cases of ATL.  
304 Although peaks in cases of the disease were observed in the 2010-2012/2016-2018, it is noted  
305 that in the years 2019 and 2020 the number of cases continued to be high, with a decline in  
306 2021. The low number of cases observed this year may be the result of several factors derived

307 from the notification or underreporting, fact that is also observed in other endemic countries for  
308 the disease.<sup>44,45,46,47,48,49</sup> The Patrocínio de Caratinga and Sapucaia districts recorded the  
309 majority of rural cases between 2007-2018. In 2019-2021, in addition to the districts mentioned  
310 above, Santa Luzia de Caratinga recorded a high number of cases in the rural area. A high  
311 frequency of urban cases was detected in the last three years (28.45%) when compared to the  
312 historical series (13.17%). The increase in cases in the urban area as well as the expansion of  
313 the area of occurrence of transmission may be due to several factors such as the displacement  
314 of rural populations to urban areas and vice versa, migratory flows of the parasite reservoirs  
315 and the adaptation of vector species to modified environments. The latter can be justified since  
316 species considered vectors were collected in the urban area.

317 During the entire period analyzed, there was no homogeneity in the incidence rates. The  
318 maintenance of the high number of cases of ATL in the last three years may be due to the  
319 increase in the transmission of the disease. However, we emphasize that from 2019 onwards,  
320 the reference service for ATL in the city of Caratinga was restructured with the support of our  
321 team. This fact may have contributed to the increase of the ATL reported cases due to the  
322 improvement of diagnosis and follow-up of patients.

323 Spatial analysis provide valuable information for decision-making and policy development  
324 in health and disease prevention.<sup>50,51</sup> One of the limitations of our study, with regard to spatial  
325 analysis instruments, is the size of the municipality of Caratinga and the distance of some  
326 districts from the urban area, which leads some patients to seek care in other nearby cities,  
327 which limits and impairs the notification and epidemiological surveillance service. The  
328 accumulated incidence maps (Figures 3a and b) show that the urban area of Caratinga and the  
329 rural area of Patrocínio de Caratinga and Sapucaia were the most affected by ATL during the  
330 entire historical series.<sup>19</sup> It is observed that the change in incidence over the years can be  
331 explained by changes in the transmission of the disease,<sup>52,53</sup> it is also necessary to consider the

332 bias of reported cases. In the period 2019-2021, the cases of ATL reported in the municipality  
333 of Caratinga showed a homogeneous distribution, which justifies the distribution profile  
334 presented mainly in Figure 3a. Therefore, we clearly see that the municipality of Caratinga has,  
335 in addition to Patrocínio and Sapucaia, other areas where prevention and control measures of  
336 ALT are justified.

337 The Directional Distribution Ellipse technique was performed with the objective of  
338 confirming the distribution pattern of ATL cases. This technique helps to minimize the lack  
339 and/or inaccurate information of the notification forms that may appear about the area where  
340 the ATL occurs, since in several places affected by the disease, the Epidemiological  
341 Surveillance Service is precarious or non-existent. As a result, this technique helps to reduce  
342 the influence of these inaccuracies on the ellipse result by these variables.<sup>54,55</sup> The ellipses in  
343 the 2007-2018 period did not change much, the 2019-2021 ellipse (Figure 4a) comprised a  
344 larger area. Although the ellipse did not cover all districts of Caratinga, it included rural  
345 communities that could be considered as priority regions for disease control in the municipality.  
346 In the urban area of Caratinga (Figure 4b) the ellipse showed that a higher population density  
347 and the presence of vectors may favor transmission and/or be at risk of contracting the disease.

348 Confirming the previous spatial analyses, Kernel Density showed that the districts of  
349 Patrocínio de Caratinga and Sapucaia and the urban area of Caratinga have several hotspots  
350 along the historical series. In the last three years, the hotspot coverage area increased not only  
351 in the mentioned areas but also in other areas of the municipality. The use of this technique  
352 showed that ATL densities may be related to the increase in land use and agricultural practices.  
353 The large number of deforested areas associated with the process of disordered human  
354 occupation increases the risk factors for the establishment of areas of transmission. These facts  
355 favor the proximity of the vectors not only in the peridomiciliary area, but also in the forest  
356 remnants, exposing the populations of the surrounding areas.<sup>56</sup> It is noted that the urban area of

357 Caratinga presented hotspots in all periods. In Brazil, urban transmission is commonly reported  
358 for visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*.<sup>57,58,59,60,61,62,63</sup> As mentioned earlier,  
359 the constant presence of urban cases in Caratinga deserves attention. We suspected that during  
360 the period 2007-2018 LTA was urbanizing in the city.<sup>19</sup> Such a situation could be justified by  
361 the fact that the residents acquired the disease not only in the countryside, but also in the city.  
362 In the last triennium evaluated, we observed that not only the central area of the city but also  
363 the entire southern area presented a greater coverage of cases of the disease. As observed in the  
364 relative risk analysis, the city of Caratinga and Patrocínio de Caratinga district represent, in the  
365 two analyzed periods, low and high-risk areas for ATL transmission, respectively. These results  
366 reinforce the need for ATL surveillance and control measures in these areas.<sup>19,60,61,62,63</sup>

367 The last published scientific article about sand fly fauna in the municipality of Caratinga  
368 date from the 1970s.<sup>15,17</sup> In these studies, entomological collections were carried out in other  
369 areas, some of which no longer belong to the municipality. Here, we identified the sand fly  
370 fauna in Corrego Volta Grande, rural area of Patrocínio de Caratinga and in the urban area of  
371 Caratinga city and Sapucaia district. All collection areas are located in the Atlantic Forest  
372 domains. With the exception of the center of Caratinga (U5), all points possess factors that  
373 favor the presence of sand flies. In Corrego Volta Grande, the collection areas present rural  
374 characteristics with forested areas, livestock and crops, while in the district of Sapucaia and the  
375 city of Caratinga, the collection points are situated in the peri-urban and urban areas with the  
376 presence of at least one domestic animal, whose importance in maintaining urban transmission  
377 of leishmaniasis in other areas of Brazil is already known.<sup>2,14,19,64</sup>

378 The diversity of sand fly species collected in this study, with greater abundance in the rural  
379 area of Patrocínio de Caratinga, shows that these insects are adapted to different levels of  
380 anthropic actions.<sup>65</sup> In the evaluated areas, ATL cases and environmental impacts have  
381 historically been related to human occupation processes.<sup>15,17</sup> This includes deforestation, loss

382 of biodiversity and adaptation of vector species to anthropic environments. In urban  
383 environments, the presence of vegetation serves as habitats for breeding and resting places. The  
384 sand fly species found confirm the ability of these insects to adapt to diverse environments  
385 different from their natural habitats.<sup>66,67</sup> The density of vectors is related to environmental  
386 aspects favorable to peridomestic sand flies, such as the presence of vegetation, roots, tree  
387 trunks and organic matter, which are possible shelters and breeding sites for the vector.<sup>68</sup>

388 Considering that the urban area of Caratinga presents not only variable rates of ATL cases,  
389 but also a transition area between urban and rural areas, the diversity of sand flies observed in  
390 this work corroborates not only with studies carried out in the past<sup>15,17</sup> but also with current  
391 studies carried out in several areas of the state of Minas Gerais.<sup>69,70</sup>

392 As observed in Table 5, the sampling data show that the species *Ny. whitmani*, *Ny.*  
393 *intermedia* and *Mg. migonei* were the most abundant, which is worrying because outbreaks of  
394 leishmaniasis can arise in these areas. These species, widely distributed throughout South  
395 America, can tolerate and overcome environmental changes, especially those caused by human  
396 action, becoming adapted to survive new ecological niches.<sup>71,72</sup> The large number of these  
397 specimens collected may be related to the fact that the captures were made in a peridomestic  
398 environment. The abundance of these species in peridomestic areas may indicate that  
399 *Leishmania braziliensis* transmission occurs in the peridomestic environment and that the  
400 inhabitants are at risk of acquiring the infection regardless of age and sex.

401 The values of richness and diversity found in this study (Table 6) show the differences in  
402 each of the three collection areas. These differences are possibly related to the different  
403 conservation levels of the studied ecotopes, which can affect the availability of food and refuge  
404 for sand flies.<sup>71</sup> In this sense, it can be seen that the richness of sand fly species is higher in  
405 forested areas than in less forested areas.<sup>74,75</sup> This fact is in agreement with the greater richness



406 of sand flies observed in the rural area of Patrocínio de Caratinga in relation to urban  
407 environments such as the city of Caratinga and Sapucaia district.

408 The detection and identification of the rates of sand flies infected by *Leishmania* is essential  
409 to determine the risk of transmission to hosts in a given area. This fact enables adequate  
410 planning in disease prevention and control measures. The identification of vector species and  
411 the presence of human cases in the three areas of research led us to carry out a molecular  
412 research on parasites of the genus *Leishmania* in these insects. Several epidemiological studies  
413 have detected *Leishmania* infection in sand flies,<sup>76,77,78,79,80</sup> where the results of these studies  
414 indicate a variation in the frequency of infection between ~0.5%<sup>73</sup> to ~39%.<sup>81</sup> Our findings  
415 corroborate some of these studies, with ~1.23% of infection by the species *L. braziliensis*  
416 detected here, only in Patrocínio de Caratinga with the highest number of pools in point 3 (P3  
417 - 5 pools). The infection of the sand fly species found in this study by *Leishmania* is described  
418 in other studies,<sup>11,82,83</sup> and these sand fly species are involved in the dissemination of ATL in  
419 the studied areas.<sup>80,84,85,86,87</sup> However, although parasites of the genus *Leishmania* were not  
420 detected in samples collected in the urban areas of Caratinga and Sapucaia, the presence of sand  
421 flies proven to transmit *Leishmania braziliensis* is indicative of the transmission of this parasite  
422 in these locations.<sup>79,80,81</sup>

423 It is important to highlight that although the collection points in Sapucaia (T7-T10) are  
424 considered urban, these areas still have characteristic rural properties, and these places are better  
425 classified as transition areas. The presence of chicken coops and vegetable crops close to the  
426 domestic environment represent a risk factor for the creation and maintenance of a high density  
427 of vectors. Another hypothesis highlights that the diversity (H) of insects in the transition area  
428 can be justified by the location of this area between the forest and the urban environment. This  
429 fact probably led to a higher number of insects collected in Sapucaia compared to the city of  
430 Caratinga.<sup>88,89,90</sup>

431 In Brazil, the parasitological examination remains the standard for the diagnosis of ATL  
432 due to its specificity. All samples obtained from suspected cases of the cutaneous leishmaniasis  
433 form were confirmed and submitted to molecular investigation. In all of them, the species *L.*  
434 *braziliensis* was detected. According to the data obtained from the records provided by the  
435 health service, the cases of ATL come from locations where the disease is common. The cases  
436 that occurred in rural areas are correlated to forest areas where the parasite cycle is maintained,  
437 economic activity and leisure. The exposure of the individual to the natural environment is an  
438 important factor for the maintenance of the disease.<sup>40,91</sup> Transmission in urban areas, may be  
439 related to the urbanization of rural areas where there is a cycle of the parasite, the presence of  
440 vectors, reservoir animals and variation in the number of susceptible individuals.<sup>92</sup>

441 The demonstration and analysis of blood ingested by different species of sand flies provide  
442 important information for the study of *Leishmania* infection and transmission. In the present  
443 study, our analysis was able to identify five species of mammals in 40 samples of sand flies. As  
444 seen in Table 7, our data showed the relationship between vectors and certain hosts that could  
445 possibly act as reservoirs, which provides a better understanding of the different components  
446 of the transmission cycle. Interestingly, the species *Homo sapiens* was the main source of food  
447 detected in the four specimens that were fed. Some vector species feed exclusively on a specific  
448 vertebrate organism, while others feed on multiple hosts, including those known to be reservoirs  
449 of the protozoan.<sup>93,94</sup>

450 This is a spatial analysis and evaluation of the phlebotomine fauna in endemic areas of the  
451 municipality of Caratinga. We emphasize here that the spatial analysis presented limitations  
452 because they were carried out based on the information contained in the notification forms. Our  
453 results showed an overview of the epidemiological patterns of ATL in the municipality of  
454 Caratinga, based on notification data.

455 In this study, we demonstrate the diversity of sandflies found in the districts of Patrocínio  
456 and Sapucaia and in the city of Caratinga, contributing to the updating and characterization of  
457 the sand fly fauna in these locations. We present in this study the predominance of the species  
458 *Ny. whitmani*, mainly in the city of Caratinga, indicating its adaptation to environmental  
459 conditions modified by human activity, and the dominance of the species *L. braziliensis* in pools  
460 of insects and human samples. The sum of these factors confirmed the urban transmission of  
461 *Leishmania braziliensis* in Caratinga.

462 It is observed that in the last three years, cases of ATL have been increasingly reported in  
463 the urban area of Caratinga. Our entomological research showed the presence of vectors,  
464 proving that the urban area of Caratinga should be subject to surveillance by the health  
465 authorities.

466

467 Acknowledgments: To the Municipal Health Department and the Department of  
468 Epidemiological Surveillance for making the ATL records available. We also thanks to the  
469 René Rachou Institute sequencing platform.

470

471 Financial Support: Funding: RPS and CMFG are research fellows from the National Council for  
472 Scientific and Technological Development (CNPq) (302972/2019-6; 305430/2017-3)  
473 ([www.cnpq.br](http://www.cnpq.br)) RLSN was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do State of Minas  
474 Gerais – FAPEMIG. Funders had no role in study design, data collection and analysis,  
475 publication decision, or manuscript preparation.

476

477 Disclosure: There are no commercial or other associations that might pose a conflict of interest.

478

479 Authors' addresses: Rafael Luiz da Silva Neves, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz  
480 Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, E-mail: [rafaelluizneves@hotmail.com](mailto:rafaelluizneves@hotmail.com).  
481 Fabrício Thomaz de Oliveira Ker, Laboratory of Epidemiology of Infectious and Parasitic  
482 Diseases, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte,  
483 Minas Gerais, Brazil, E-mail: [fabricioker@yahoo.com.br](mailto:fabricioker@yahoo.com.br). Felipe Dutra Rêgo, René Rachou  
484 Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, E-mail:  
485 [felipe.rego@fiocruz.com](mailto:felipe.rego@fiocruz.com). Jeronimo Marteleto Nunes Rugani, René Rachou Institute, Oswaldo  
486 Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, E-mail: [jeronimo.rugani@fiocruz.br](mailto:jeronimo.rugani@fiocruz.br).  
487 José Dilermando Andrade Filho, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo  
488 Horizonte, Minas Gerais, Brazil, E-mail: [jose.andrade@fiocruz.br](mailto:jose.andrade@fiocruz.br). Rodrigo Pedro Soares, René  
489 Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, E-mail:  
490 [rodrigosoares28@hotmail.com](mailto:rodrigosoares28@hotmail.com) and Célia Maria Ferreira Gontijo, René Rachou Institute,  
491 Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, E-mail:  
492 [celia.gontijo@fiocruz.br](mailto:celia.gontijo@fiocruz.br).

493

494

## REFERENCES

- 495 1. WHO. World Health Organization, 2010. Control of the leishmaniasis: report of a  
496 meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–  
497 26 March 2010. WHO Technical Report Series, n° 949.
- 498 2. Lacerda AFA, Oliveira DS, Salomão JV, Oliveira LGR, Monte-Alegre A, Santos JYG,  
499 Souza CC, Magalhães-Junior JT, Araújo-Santos T, 2021. Clinical, epidemiological and  
500 transmission cycle aspects of leishmaniasis urbanization in Barreiras, Bahia, Brazil.  
501 *Spatial and Spatio-temporal Epidemiology* 36: 100395.
- 502 3. Fonseca ES, D'Andrea LAZ, Taniguchi HH, Hiramoto RM, Tolezano JE, Guimarães  
503 RB, 2014. Spatial epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in a municipality  
504 of West São Paulo State, Brazil. *J Vector Borne Dis* 51: 271-275.
- 505 4. Gonçalves NV et al., 2019. Cutaneous leishmaniasis: Spatial distribution and  
506 environmental risk factors in the state of Pará, Brazilian Eastern Amazon. *J Infect Dev*  
507 *Ctries* 13: 939-944.
- 508 5. Bruhn FRP, Morais MHF, Bruhn NCP, Cardoso DL, Ferreira F, Rocha CMBM, 2018.  
509 Human visceral leishmaniasis: factors associated with deaths in Belo Horizonte, Minas  
510 Gerais state, Brazil from 2006 to 2013. *Epidemiol Infect* 146: 565-570.
- 511 6. Souza VA, Cortez LR, Dias RA, Amaku M, Neto JSF, Kuroda RBS, Ferreira F, 2012.  
512 Space-time cluster analysis of American visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo  
513 State, Brazil. *Cad Saude Publica* 28: 1949-1964.
- 514 7. Vieira CP, Oliveira AM, Rodas LA, Dibo MR, Guirado MM, Chiaravalloti Neto F,  
515 2014. Temporal, spatial and spatiotemporal analysis of the occurrence of visceral  
516 leishmaniasis in humans in the City of Birigui, State of São Paulo, from 1999 to 2012.  
517 *Rev Soc Bras Med Trop* 47: 350-358.
- 518 8. Almeida CP, Cavalcante FRA, Moreno JO, Florêncio CMGD, Cavalcante KKS,  
519 Alencar CH, 2020. Visceral Leishmaniasis: temporal and spatial distribution in  
520 Fortaleza, Ceará State, Brazil, 2007-2017. *Epidemiol Serv Saude* 29: e2019422.
- 521 9. Drumond KO, Costa FA, 2011. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of  
522 Piauí: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 53: 3-11.
- 523 10. Marzochi MC, 2016. Visceral leishmaniasis in Southern Rio de Janeiro State and the  
524 risk of propagation to São Paulo State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 49:147-149.

- 525 **11.** Rêgo FD, Soares RP, 2021. *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector.  
526 *An Acad Bras Cienc* 93: e20200254.
- 527 **12.** Salomon OD, 2021. *Lutzomyia longipalpis*, Gone with the Wind and Other Variables.  
528 *Neotrop Entomol* 50: 161-171.
- 529 **13.** Maia-Elkhoury AN, Yadón ZE, Díaz MIS, Lucena FFA, Castellanos LG, Vazquez MJS,  
530 2016. Exploring Spatial and Temporal Distribution of Cutaneous Leishmaniasis in the  
531 Americas, 2001–2011. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0005086.
- 532 **14.** Gil JF, Nasser JR, Cajal SP, Juarez M, Acosta N, Cimino RO, Diosque P, Krolewiecki  
533 AJ, 2010. Urban transmission of American cutaneous leishmaniasis in Argentina:  
534 spatial analysis study. *Am J Trop Med Hyg* 82: 433-440.
- 535 **15.** Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, da Costa  
536 CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL, 1979. Epidemiology of dermal leishmaniasis in  
537 the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 73: 123-  
538 137.
- 539 **16.** Cardoso DT, de Souza DC, de Castro VN, Geiger SM, Barbosa DS, 2019. Identification  
540 of priority areas for surveillance of cutaneous leishmaniasis using spatial analysis  
541 approaches in Southeastern Brazil. *BMC Infect Dis* 19: 318.
- 542 **17.** Dias M, Mayrink W, Deane LM, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Batista SM,  
543 Araújo FG, Coelho MV, Williams P, 1977. Epidemiology of mucocutaneous  
544 leishmaniasis Americana. I. Study of reservoirs in an endemic region of the State of  
545 Minas Gerais. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 19: 403-410.
- 546 **18.** Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, Michalick MS,  
547 Williams P, 1979. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis.  
548 *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 385-387.
- 549 **19.** Neves RL, Cardoso DT, Rêgo FD, Gontijo CM, Barbosa DS, Soares RP, 2021. A  
550 follow-up study (2007-2018) on American Tegumentary Leishmaniasis in the  
551 municipality of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil: Spatial analyses and sand fly  
552 collection. *PLoS Negl Trop Dis* 15: e0009429.
- 553 **20.** Confalonieri UE, Margonari C, Quintão AF, 2013. Environmental change and the  
554 dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Trop* 129: 33–41.
- 555 **21.** Salomón OD et al., 2006. Tegumentary leishmaniasis outbreak in Bella Vista City,  
556 Corrientes, Argentina during 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 767-774.
- 557 **22.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2022. Available at:  
558 <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/caratinga/panorama>. Accessed May 30, 2022.

- 559 23. ESRI, 2022. Environmental Systems Research Institute. Available at:  
 560 <https://desktop.arcgis.com/en/arcmap/10.3/tools/spatial-statistics-toolbox/directional->  
 561 [distribution.htm](https://desktop.arcgis.com/en/arcmap/10.3/tools/spatial-statistics-toolbox/directional-distribution.htm). Accessed May 30, 2022.
- 562 24. Yuill, RS, 1971. The Standard Deviational Ellipse; An Updated Tool for Spatial  
 563 Description. *Geografiska Annaler. Series B, Human Geography* 53: 28-39.
- 564 25. ESRI, 2018. Environmental Systems Research Institute. ArcGIS Desktop: Release  
 565 10.6.1. Redlands, CA.
- 566 26. Kulldorff M. SaTScan—Software for the spatial, temporal, and spacetime scan statistics.  
 567 Boston; 2016.
- 568 27. Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES, 2005. HP: an improved  
 569 model of suction light trap for the capture of small insects. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*  
 570 *38*: 70-72.
- 571 28. Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen TJ, 2005. A new statistical approach for  
 572 assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol.*  
 573 *Lett* 8: 148-159.
- 574 29. StataCorp, 2015. Statistical Software. Available at: <https://www.stata.com/vailable>  
 575 from <https://www.stata.com/>. Accessed May 30, 2022.
- 576 30. el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schönian G, 2000. Genetic heterogeneity  
 577 of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani*  
 578 spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and  
 579 sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 575-579.
- 580 31. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe  
 581 CL, 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported  
 582 clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 349-358.
- 583 32. Zang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W, 2000. A greedy algorithm for aligning DNA  
 584 sequences. *J Comput Biol* 7: 203-214.
- 585 33. Boakye DA, Tang J, Truc P, Merriweather A, Unnasch TR, 1999. Identification of  
 586 bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Med*  
 587 *Vet Entomol* 13: 282-287.
- 588 34. Carvalho GML, Rêgo FD, Tanure A, Silva ACP, Dias TA, Paz GF, Andrade Filho JD,  
 589 2017. Bloodmeal identification in field-collected sand flies from casa branca, Brazil,  
 590 using the cytochrome b PCR method. *J Med Entomol* 54: 1049-1054.
- 591 35. Stucky, B. J. 2012. SeqTrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing  
 592 chromatograms. *J. Biomol. Tech* 23: 90-93.

- 593 **36.** Oliart-Guzmán H, Martins AC, Mantovani SAS, Braña AM, Delfino BM, Pereira TM,  
594 Santos AP, Júnior, JAF, Branco FLCC, Campos RG, Oliveira CSM, Muniz PT, Silva-  
595 Nunes M, 2013. Epidemiological profile of American cutaneous leishmaniasis in the  
596 amazonian frontier: a retrospective study in Assis Brasil, *Acre, Brazil. Rev Patol Trop*  
597 *42*: 187-200.
- 598 **37.** Portella TP, Kraenkel RA, 2021. Spatial-temporal pattern of cutaneous leishmaniasis in  
599 Brazil. *Infect Dis Poverty* *16*: 86.
- 600 **38.** Teles GDC, Fonseca FR, Gonçalves MJF. American Tegumentary Leishmaniasis in the  
601 Brazilian Amazon from 2010 to 2014, 2019. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* *61*: e22.
- 602 **39.** Gonçalves AFLS, Lima SS, Silva APSC, Barbosa CC, 2020. Spatial dynamics and  
603 socioeconomic factors correlated with American cutaneous leishmaniasis in  
604 Pernambuco, Brazil from 2008 to 2017. *Rev Soc Bras Med Trop* *53*: e20190373.
- 605 **40.** Melo HA, Rossoni DF, Teodoro U, 2017. Spatial distribution of cutaneous  
606 leishmaniasis in the state of Paraná, Brazil. *PloS One* *12*: e0185401.
- 607 **41.** Salgueiro MM, Pimentel MIF, Miranda LFC, Cunha E Silva RR, Oliveira LFA, Lyra  
608 MR, Saheki MN, Valette-Rosalino CM, Martins ACC, Schubach AO, Marzochi MCA,  
609 Bedoya-Pacheco SJ, 2022. Parasite species variation and impact of spatial displacement  
610 of the population on cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop*  
611 *Med Hyg* *116*: 70-79.
- 612 **42.** Ursine RL, Rocha MF, Sousa JF, Santos RCD, Soares MD, Gusmão MSF, Leite ME,  
613 Vieira TM, 2021. American Tegumentary Leishmaniasis in an endemic municipality in  
614 the North of Minas Gerais State: spatial analysis and socio-environmental factors. *Rev*  
615 *Inst Med Trop Sao Paulo* *63*: e2.
- 616 **43.** Temponi AOD, Brito MG, Ferraz ML, Diniz SA, Silva MX, Cunha TND, 2018.  
617 Ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar americana: uma análise multivariada  
618 dos circuitos espaciais de produção, Minas Gerais, Brasil, 2007 a 2011. *Cad Saude*  
619 *Publica* *34*: e00165716.
- 620 **44.** Hernández AM, Gutierrez JD, Xiao Y, Branscum AJ, Cuadros DF, 2019. Spatial  
621 epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: socioeconomic and  
622 demographic factors associated with a growing epidemic. *Trans R Soc Trop Med Hyg*  
623 *29*: trz043.
- 624 **45.** Bayles BR, Rusk AE, Pineda MA, Chen B, Dagy K, Hummel T, Kuwada K, Martin S,  
625 Guzmán CF, 2021. Spatiotemporal trends of cutaneous leishmaniasis in Costa Rica.  
626 *Trans R Soc Trop Med Hyg* *115*: 569-571.

- 627 46. Seneviratne SL, Gunatilake SB, Silva HJ, 1997. Reporting notifiable diseases: methods  
628 for improvement, attitudes and community outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91:  
629 135-37.
- 630 47. Desjeux P, 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol*  
631 *Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- 632 48. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jamin J, den Boer M, 2012.  
633 WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of  
634 its incidence. *PloS One* 7: e35671.
- 635 49. Yadón ZE, Quigley MA, Davies CR, Rodrigues LC, Segura EL, 2001. Assessment of  
636 leishmaniasis notification system in Santiago del Estero, Argentina, 1990-1993. *Am J*  
637 *Trop Med Hyg* 65: 27-30.
- 638 50. Ayubi E, Barati M, Dabbagh Moghaddam A, Reza Khoshdel A, 2018. Spatial modeling  
639 of cutaneous leishmaniasis in Iranian army units during 2014-2017 using a hierarchical  
640 Bayesian method and the spatial scan statistic. *Epidemiol Health* 40: e2018032.
- 641 51. Firouraghi N, Mohammadi A, Hamer DH, Bergquist R, Mostafavi SM, Shamsoddini A,  
642 Raouf-Rahmati A, Fakhar M, Moghaddas E, Kiani B, 2022. Spatio-temporal  
643 visualisation of cutaneous leishmaniasis in an endemic, urban area in Iran. *Acta Trop*  
644 225: 106181.
- 645 52. Chaves LF, Cohen JM, Pascual M, Wilson ML, 2008. Social exclusion modifies climate  
646 and deforestation impacts on a vector-borne disease. *PloS Negl Trop Dis* 2: e176.
- 647 53. Karagiannis-Voules DA, Scholte RGC, Guimarães LH, Utzinger J, Vounatsou P, 2013.  
648 Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. *PloS Negl Trop*  
649 *Dis* 7: e2213.
- 650 54. Duncan EW, White NM, Mengersen, K, 2017. Spatial smoothing in Bayesian models:  
651 a comparison of weights matrix specifications and their impact on inference. *Int J*  
652 *Health Geogr* 16: 47.
- 653 55. Cruz CDSS, Cardoso DT, Ferreira Júnior CL, Barbosa DS, Carneiro M, 2022. Spatial  
654 and spatiotemporal patterns of human visceral leishmaniasis in an endemic southeastern  
655 area in countryside Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 55: e07022021.
- 656 56. Oliveira RAC, Miranda CDSC, Guedes JA, Filgueiras TGM, Bichara CNC, Araújo MS,  
657 Martins CNSAT, Nunes EFC, Cabeça ALLCR, De Rezende MAC, Noguchi SKDT,  
658 Gonçalves NV, 2021. Cutaneous leishmaniasis in protected environmental areas in the  
659 Eastern Amazon: the case of São Félix do Xingu, Pará, Brazil. *J Infect Dev Ctries* 15:  
660 1724-1730.



- 661 57. Barbosa DS, Belo VS, Rangel ME, Werneck GL, 2014. Spatial analysis for  
662 identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis  
663 endemic area in Brazil. *Acta Trop* 131: 56-62.
- 664 58. França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink  
665 W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E, 2003. Epidemiology of canine  
666 visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais  
667 State, Brazil. *Vet Parasitol* 111: 161-173.
- 668 59. Rocha ATF, Espindola GM, Soares MRA, Rocha JRS, Costa CHN, 2018. Visceral  
669 leishmaniasis and vulnerability conditions in an endemic urban area of Northeastern  
670 Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 112: 317-325.
- 671 60. Andrade IM, Santana GMS, Sacramento RVO, 2014. Geoprocessing health: A study on  
672 American Tegumentary Leishmaniasis in Vale of Jiquiriçá, Bahia, Brazil. *Revista*  
673 *Brasileira de Geografia Médica e da Saúde – Hygeia* 10: 1-13.
- 674 61. Silva NS, Viana AB, Cordeiro JA, Cavasini CE, 1999. American cutaneous  
675 leishmaniasis in the State of Acre, Brazil. *Rev Saude Publica* 33: 554-559.
- 676 62. Silva NS, Muniz VD, 2009. Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in  
677 the State of Acre, Brazilian Amazon. *Cad Saude Pública* 25: 1325-1336.
- 678 63. Buzanovsky LP, Sanchez-Vazquez MJ, Maia-Elkhoury ANS, Werneck GL, 2020.  
679 Major environmental and socioeconomic determinants of cutaneous leishmaniasis in  
680 Brazil – a systematic literature review. *Rev Soc Bras Med Trop* 53: e20190291.
- 681 64. Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A, 2001. A urbanização  
682 das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região  
683 Metropolitana de Belo Horizonte. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina*  
684 *Tropical* 34: 249-254.
- 685 65. Tonelli GB, Binder C, Nogueira VLC, Prado MH, Theobaldo GG, Campos AM, de  
686 Souza CM, Andrade-Filho JD, 2021. The sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the  
687 urban area of Lassance, Northeast Minas Gerais, Brazil. *PLoS One* 16: e0257043.
- 688 66. Barata RA et al., 2005. Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in  
689 endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med*  
690 *Trop* 3: 421-425.
- 691 67. Vieira VR, Azevedo ACR, Alves JRC, Guimarães AE, Aguiar GM, 2015. Ecological  
692 Aspects of Phlebotomine Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Areas of  
693 American Cutaneous Leishmaniasis, in the Municipality of Paraty, Rio de Janeiro,

- 694 Brazil. I-Index of Abundance by Location and Type of Capture. *J Med Entomol* 52:  
695 886-895.
- 696 **68.** Miranda JC, Reis A, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, Octavio F,  
697 Barral-Netto M, Barral A, 2002. Frequency of infection of *Lutzomyia phlebotomines*  
698 with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pin-point  
699 capture and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 185-188.
- 700 **69.** Rêgo FD, Shimabukuro PHF, Quaresma PF, Coelho IR, Tonelli GB, Silva KMS, Barata  
701 RA, Dias ES, Gontijo CMF, 2014. Ecological aspects of the Phlebotominae fauna  
702 (Diptera: Psychodidae) in the Xakriabá Indigenous Reserve. *Brazil Parasit Vectors* 7:  
703 220.
- 704 **70.** Sanguinette CC, Silva DF, Stumpp RGAV, Rego FD, Tonelli GB, Tanure A, Gontijo  
705 CMF, Andrade-Filho JD, 2015. Comparison of the phlebotomine (Diptera:  
706 Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais,  
707 Brazil. *Parasites & Vectors* 8: 428.
- 708 **71.** Peterson A, Shaw J, 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in southern  
709 Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change  
710 effects. *Int J Parasitol* 33: 919-931.
- 711 **72.** Ready PD, 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech* 27: 399–  
712 412.
- 713 **73.** Pinto IS, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A, 2010. Richness and diversity of sand  
714 flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. *J*  
715 *Vect. Ecol* 35: 325-332.
- 716 **74.** Pinto IS, Ferreira AL, Valim V, Carvalho FS, Silva GM, Falcão AL, Dietze R, Falqueto  
717 A, 2012. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis  
718 areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *J Vector Ecol*  
719 37: 90-96.
- 720 **75.** Virgens TM, Santos CB, Pinto IS, Silva KS, Leal FC, Falqueto A, 2008. Phlebotomine  
721 sand flies (Diptera, Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis  
722 transmission area in northern Espírito Santo state, Brazil. *Cad. Saúde Públ* 24: 2969-  
723 2978.
- 724 **76.** Lara-Silva FO et al., 2015 Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic  
725 reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral  
726 leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop* 148: 128-136.

- 727 77. Lana RS, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Lara-Silva FO, Lima  
728 ACVMR, Avelar DM, Martins JCD, Dias ES, 2015. Phlebotomine sand fly fauna and  
729 leishmania infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a natural  
730 Brazilian heritage site. *Boimed Res Int* 2015: 385493.
- 731 78. Margonari C et al., 2010. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and  
732 Leishmania infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol* 47: 1212-  
733 1219.
- 734 79. Michalsky EM, Guedes KS, Silva FOL, França-Silva JC, Dias CLF, Barata RA, Dias  
735 ES, 2011. Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia*  
736 (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality  
737 of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 58-62.
- 738 80. Rêgo FD, Rugani JMN, Shimabukuro PHF, Tonelli GB, Quaresma PF, Gontijo CMF,  
739 2015. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera:  
740 Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve,  
741 Brazil. *PLoS One* 10: e0122038.
- 742 81. Ávila MM, Brilhante AF, Souza CF, Bevilacqua PD Galati EAB, Brazil RP, 2018.  
743 Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies  
744 in an area of high incidence of American Tegumentary Leishmaniasis in the  
745 municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. *Parasit Vectors* 11: 64.
- 746 82. Ryan L, Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, 1984. Leishmanial infections in *Lutzomyia*  
747 *longipalpis* and *Lu. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State,  
748 Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78: 547-  
749 548.
- 750 83. Guimarães-Silva AS, Silva SO, Ribeiro da Silva RC, Pinheiro VCS, Rebêlo JMM, Melo  
751 MN, 2017. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of  
752 Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. *PLoS ONE* 12: e0179052.
- 753 84. Gontijo CMF, Silva ES, Fuccio MB, Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade-Filho  
754 JD, Brazil RP, Melo MN, 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous  
755 leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* 81: 143-  
756 150.
- 757 85. Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC,  
758 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei*  
759 with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR

- 760 multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Transactions of the Royal Society of*  
761 *Tropical Medicine and Hygiene* 99: 905-913.
- 762 **86.** Saraiva L, Andrade-Filho JD, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN, 2010. The molecular  
763 detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and  
764 visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto*  
765 *Oswaldo Cruz* 105: 1033-1039.
- 766 **87.** Tonelli GB, Tanure A, Rêgo FD, Carvalho GMDL, Simões TC, Andrade-Filho JD,  
767 2017. Aspects of the ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the  
768 Private Natural Heritage Reserve Sanctuary Caraça. *PLoS One* 12: e0178628.
- 769 **88.** Alves GB, Oshiro ET, Leite MC, Melão AV, Ribeiro LM, Mateus NLF, Brazil, RP,  
770 Andrade-Filho JD, Oliveira AG, 2012. Phlebotomine sandflies fauna (Diptera:  
771 Psychodidae) at rural settlements in the municipality of Cáceres, state of Mato Grosso,  
772 Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 437-443.
- 773 **89.** Oliveira AG, Galati EAB, Oliveira O, Oliveira GR, Espíndola IAC, Dorval MEC, Brazil  
774 RP, 2006. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)  
775 and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato  
776 Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 869-874.
- 777 **90.** Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo G, Rocha HC, 2003. Aspectos do comportamento  
778 da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e  
779 tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul,  
780 Brasil. *Rev Patol Trop* 32: 235-261.
- 781 **91.** Melchior LA, Brilhante AF, Chiaravalloti-Neto F, 2017. Spatial and temporal  
782 distribution of American cutaneous leishmaniasis in Acre State, Brazil. *Infect Dis*  
783 *Poverty* 6: 99.
- 784 **92.** Machado-Coelho GL, Assunção R, Mayrink W, Caiiffa WT, 1999. American cutaneous  
785 leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering. *Int J Epidemiol* 28: 982-989.
- 786 **93.** Meece, JK, Reynolds CE, Stockwell PJ, Jenson TA, Christensen JE, Reed KD, 2005.  
787 Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length  
788 polymorphism profile analysis of the cytochrome B gene. *J. Med. Entomol* 42: 657-  
789 667.
- 790 **94.** Oshaghi, MA, Yaghoobi F, Vatandoost H, Abai MR, Akbarzadeh K, 2006. *Anopheles*  
791 *stephensi* biological forms, geographical distribution, and malaria transmission in  
792 malarious regions in Iran. *Pak J Biol Sci* 9: 294-298.
- 793

794 **Table 1.** Demographic and clinical characteristics of ATL cases in the municipality of Caratinga from 2019 to  
 795 2021 in comparison to 2007-2018

Characteristic	2019-2021			2007-2018		
	Male	Female	n (%)	Male	Female	n (%)
Male			70 (64.22)			183 (57.37)
Female			39 (35.78)			136 (42.63)
<b>Age group (years) by gender</b>						
<1	1 (1.43)	0 (0)	0.92	1	0	0.31
1-10	4 (5.71)	5 (12.82)	8.26	18	19	11.60
11-20	5 (7.14)	7 (17.95)	11.01	46	19	20.38
21-30	10 (14.29)	9 (23.08)	17.43	27	18	14.11
31-40	12 (17.14)	3 (7.69)	13.76	25	28	16.61
41-50	11 (15.71)	2 (5.13)	11.93	22	23	14.11
51-60	13 (18.57)	4 (10.26)	15.60	23	11	10.66
61-70	12 (17.14)	4 (10.26)	14.68	14	12	8.15
71-80	1 (1.43)	1 (2.56)	1.83	7	3	3.13
≥81	1 (1.43)	4 (10.26)	4.59	0	3	0.94
<b>Education level</b>						
Illiterate			0 (0.00)			8 (2.51)
Incomplete elementary school			22 (20.18)			243 (76.18)
Complete primary education			5 (4.59)			4 (1.25)
High school			3 (2.75)			2 (0.63)
No school age			6 (5.50)			19 (5.96)
College			1 (0.92)			0 (0.00)
Uninformed			35 (32.11)			31 (9.72)
Ignored			37 (33.94)			12 (3.76)
<b>Clinical form</b>						
Cutaneous			108 (99.08)			311 (97.49)
Mucocutaneous			1 (0.92)			8 (2.51)
<b>Case outcome</b>						
Clinical cure			50 (45.87)			300 (94.04)
Abandonment treatment			1 (0.92)			7 (2.19)
Death of other cause			2 (1.83)			1 (0.31)
Transfer			0 (0.00)			1 (0.31)
Not informed			56 (51.38)			10 (3.13)
<b>Area of notification</b>						
Urban			31 (28.45)			42 (13.17)
Periurban			0 (0.00)			9 (2.82)
Rural			78 (71.55)			268 (84.01)

796  
 797  
 798  
 799  
 800  
 801  
 802  
 803  
 804  
 805  
 806  
 807  
 808  
 809  
 810  
 811  
 812  
 813  
 814  
 815  
 816

817 **Table 2.** Number of cases, incidence per 10.000 inhabitant of ATL and population of the municipality of Caratinga  
818 from 2019 to 2021

Year	n	Population	Incidence	Incidence per triennium
2007	6	83.363	0.72	
2008	19	84.825	2.24	5.06
2009	18	85.469	2.11	
2010	56	85.239	6.57	
2011	39	85.811	4.54	11.88
2012	7	86.364	0.81	
2013	12	89.578	1.34	
2014	9	90.192	1.00	5.21
2015	26	90.782	2.86	
2016	41	91.342	4.49	
2017	39	91.841	4.25	13.82
2018	47	91.503	5.14	
2019	44	92.062	4.78	
2020	46	92.603	4.97	11.77
2021	19	93.124	2.04	
Total	428			4.74

819

820 **Table 3.** Number of ATL cases by city/district during the period from 2019 to 2021

District	2007-	2010-	2013-	2016-	2007-2018		2019-	2007-2021	
	2009	2012	2015	2018	n	%	n	n	%
Caratinga	10	22	11	20	63	19.75	25	88	20.56
Cordeiro de Minas	0	2	0	2	4	1.25	3	7	1.64
Dom Lara	1	0	1	2	4	1.25	2	6	1.40
Dom Modesto	1	2	1	4	8	2.51	7	15	3.50
Patrocínio de Caratinga	6	53	30	57	146	45.77	21	167	39.02
Santa Efigênia de Caratinga	5	8	1	4	18	5.64	7	25	5.84
Santa Luzia de Caratinga	1	1	0	9	11	3.45	15	26	6.07
Santo Antônio do Manhuaçu	3	10	1	5	19	5.96	10	29	6.78
São Cândido	0	0	1	1	2	0.63	2	4	0.93
São João do Jacutinga	6	1	1	7	15	4.70	4	19	4.44
Sapucaia	10	3	0	16	29	9.09	13	42	9.81
Total	43	102	47	127	319	100	109	428	100

821

822

823

**Table 4.** Affected area by triennium in municipality of Caratinga

Triennium	Affected area (km <sup>2</sup> )	Increase (km <sup>2</sup> )	Accumulated affected area (km <sup>2</sup> )
2007-2009	39		39
2010-2012	66	+56	95
2013-2015	34	+15	110
2016-2018	68	+29	139
2019-2021	82	+32	171

824

825

826

827

828

829

**Table 5.** Number of sandflies collected per year of collection in the municipality of Caratinga

Species	2020			2021			Total			Total (%)
	Patrocínio de Caratinga			Caratinga (urban area) and Sapucaia						
	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
<i>Brumptomyia cunhai</i>	3	0	3	0	0	0	3	0	3	0.02
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	0	0	0	20	37	57	20	37	57	0.44
<i>Evandromyia lenti</i>	100	138	238	0	0	0	100	138	238	1.82
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	11	142	153	0	0	0	11	142	153	1.17
<i>Micropygomyia capixaba</i>	2	0	2	0	0	0	2	0	2	0.02
<i>Migonemyia migonei</i>	1,372	1,591	2,963	51	64	115	1,423	1,655	3,078	23.60
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1,515	2,335	3,850	44	54	98	1,559	2,389	3,948	30.27
<i>Nyssomyia neivai</i>	40	68	108	0	0	0	40	68	108	0.83
<i>Nyssomyia whitmani</i>	2,097	2,827	4,924	143	168	311	2,240	2,995	5,235	40.14
<i>Pintomyia pessoai</i>	98	120	218	0	0	0	98	120	218	1.67
<i>Sciopemyia microps</i>	0	3	3	0	0	0	0	3	3	0.02
Total (%)	5,238	7,224	12,462	258	323	581	5,496	7,547	13,043	100
	42.03	57.97	100	44.41	55.59	100	42.14	57.86		

831

**Table 6.** Diversity indices of vector species in the municipality of Caratinga

Index	Caratinga (urban area)	Sapucaia	Patrocínio de Caratinga	Total
Taxa (S)	2	4	10	11
Individuals (N)	149	432	12462	13043
Dominance (D)	0.768	0.298	0.309	0.309
Simpson (1-D)	0.232	0.702	0.691	0.691
Shannon (H)	0.394	1.293	1.318	1.331
Margalef	0.199	0.494	0.954	1.055
Equitability (J)	0.569	0.933	0.572	0.555

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844 **Table 7.** Blood meal sources identified from sand fly females collected in the municipality of Caratinga, during  
 845 2020-2021

Species	Blood meal	Total score	Query cover (%)	E-value	Identity (%)
<i>Evandromyia lenti</i>	<i>Homo sapiens</i>	468	100	2e-127	94.16
<i>Migonemyia migonei</i>	<i>Homo sapiens</i>	431	100	6e-116	90.85
	<i>Homo sapiens</i>	573	100	8e-159	99.69
	<i>Homo sapiens</i>	466	100	7e-127	95.93
	<i>Homo sapiens</i>	383	100	8e-102	87.94
	<i>Homo sapiens</i>	500	97	4e-137	94.44
	<i>Homo sapiens</i>	567	98	3e-157	99.38
	<i>Gallus gallus</i>	513	97	7e-141	95.18
	<i>Gallus gallus</i>	512	100	2e-140	96.55
	<i>Homo sapiens</i>	573	100	8e-159	99.69
	<i>Gallus gallus</i>	532	100	2e-146	99.66
<i>Nyssomyia intermedia</i>	<i>Homo sapiens</i>	555	100	3e-153	99.36
	<i>Homo sapiens</i>	645	94	6e-156	100.00
	<i>Homo sapiens</i>	570	100	1e-157	99.69
	<i>Sus scrofa</i>	950	100	2e-158	98.49
	<i>Sus scrofa</i>	896	100	4e-154	99.06
	<i>Bos taurus</i>	572	97	3e-158	98.79
	<i>Sus scrofa</i>	833	96	9e-155	99.37
	<i>Homo sapiens</i>	444	100	3e-120	91.46
	<i>Homo sapiens</i>	571	98	3e-158	99.38
	<i>Sus scrofa</i>	778	100	8e-156	99.37
	<i>Gallus gallus</i>	567	96	3e-157	100.00
	<i>Sus scrofa</i>	535	100	2e-147	98.38
	<i>Sus scrofa</i>	575	96	2e-159	99.69
	<i>Sus scrofa</i>	349	100	1e-91	90.64
<i>Nyssomyia whitmani</i>	<i>Sus scrofa</i>	851	100	3e-155	99.68
	<i>Gallus gallus</i>	562	97	1e-155	99.38
	<i>Gallus gallus</i>	428	96	2e-115	89.57
	<i>Gallus gallus</i>	524	96	4e-144	96.85
	<i>Gallus gallus</i>	535	95	2e-147	97.77
	<i>Homo sapiens</i>	536	95	6e-148	99.35
	<i>Homo sapiens</i>	542	98	1e-149	98.72
	<i>Sus scrofa</i>	852	98	8e-150	98.14
	<i>Sus scrofa</i>	872	100	2e-137	95.56
	<i>Bos taurus</i>	527	95	3e-145	96.88
	<i>Capra hircus</i>	687	98	8e-160	99.69
	<i>Sus scrofa</i>	824	90	4e-154	99.07
	<i>Gallus gallus</i>	478	100	1e-129	96.31
	<i>Gallus gallus</i>	559	100	3e-154	99.07
	<i>Homo sapiens</i>	581	97	2e-161	100.00

846

847

848

849

850

851

852



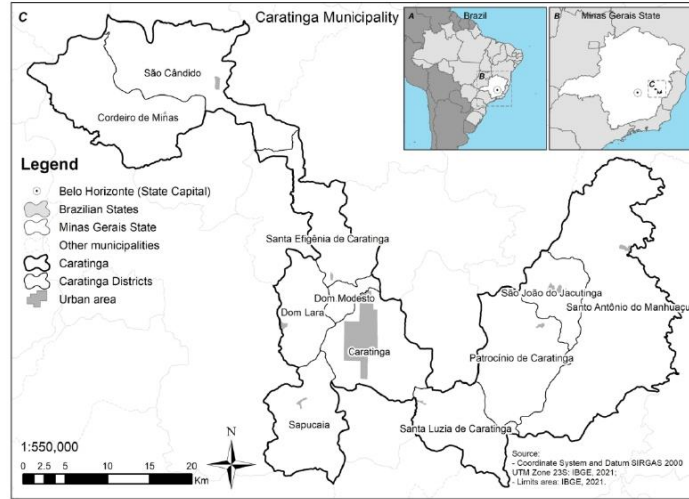


Figure 1. Geographic localization of municipality of Caratinga, Minas Gerais state, Brazil. A: Localization of Brazil in South America. B: Localization of Minas Gerais state in Brazil. C: Municipality of Caratinga.

149x108mm (300 x 300 DPI)



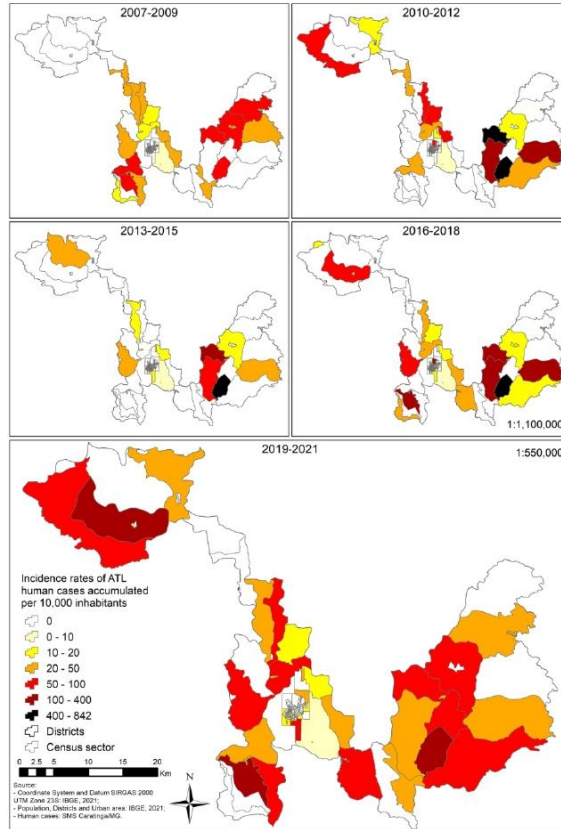


Figure 3a. Incidence rates of ATL human cases accumulated per 10,000 inhabitants in the municipality of Caratinga during study periods.

150x219mm (300 x 300 DPI)

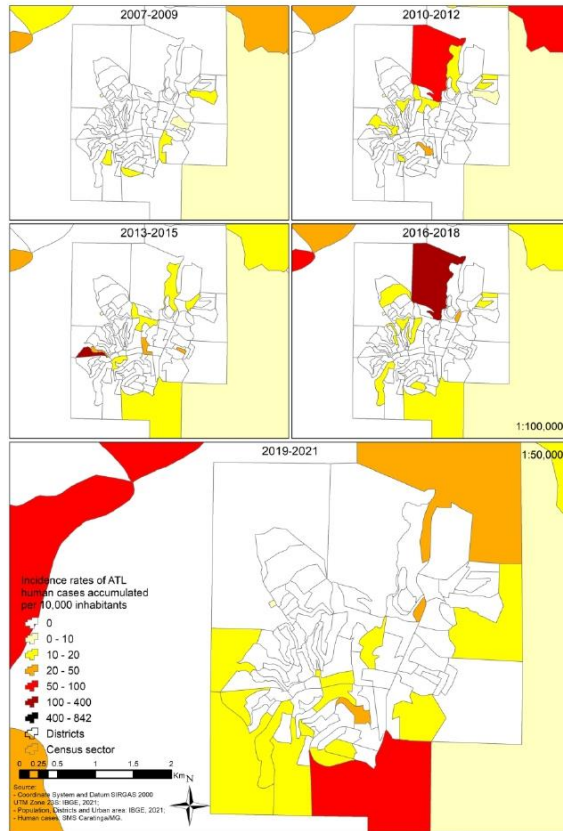


Figure 3b. Incidence rates of ATL human cases accumulated per 10,000 inhabitants in the urban area of Caratinga during study periods.

150x219mm (300 x 300 DPI)

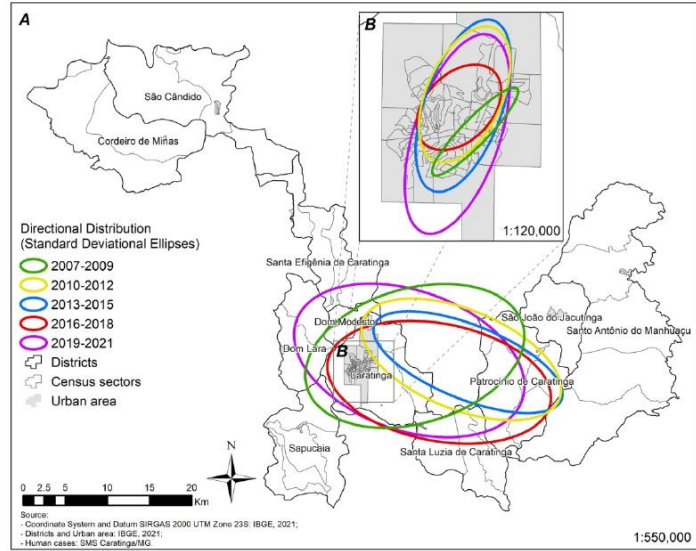


Figure 4. Directional Distribution Ellipses of ATL cases in municipality of Caratinga (A) and urban area of Caratinga (B).

150x120mm (300 x 300 DPI)

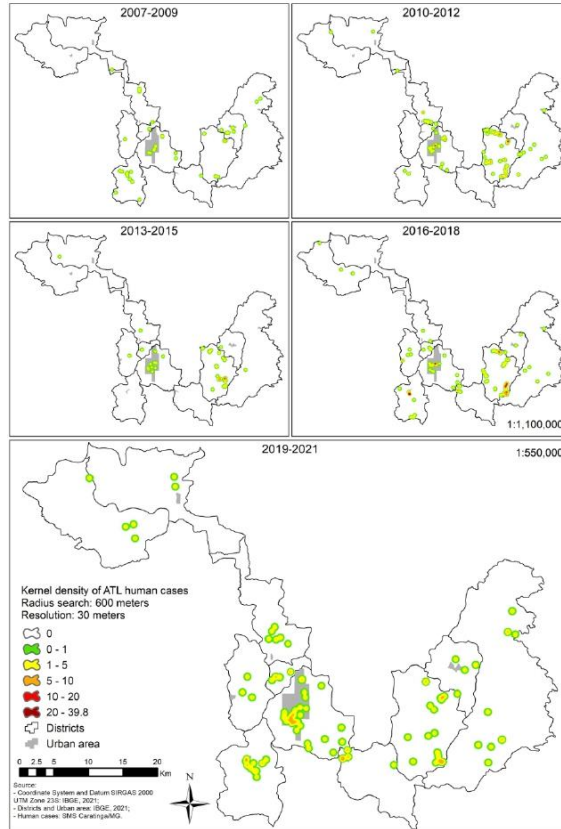


Figure 5a. Kernel density of ATL human cases in the municipality of Caratinga during study periods.

150x219mm (300 x 300 DPI)

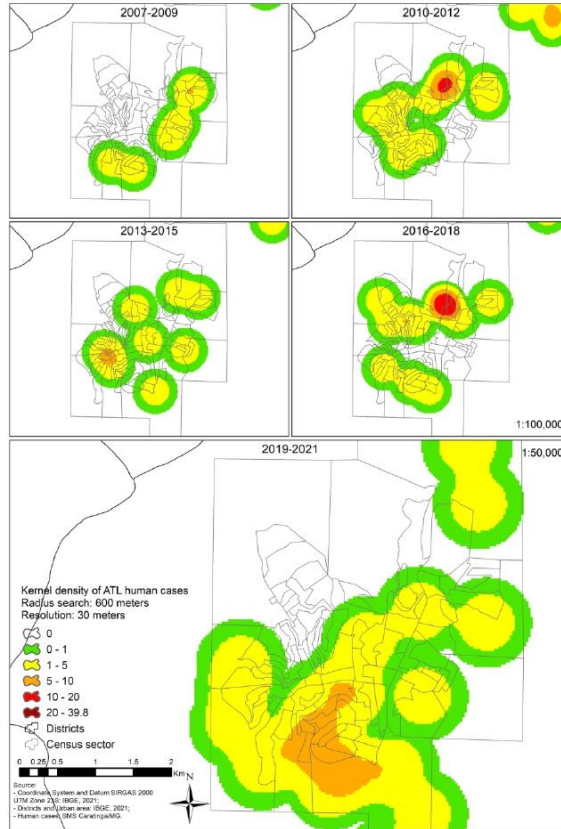


Figure 5b. Kernel density of ATL human cases in the urban area of Caratinga during study periods.

150x219mm (300 x 300 DPI)

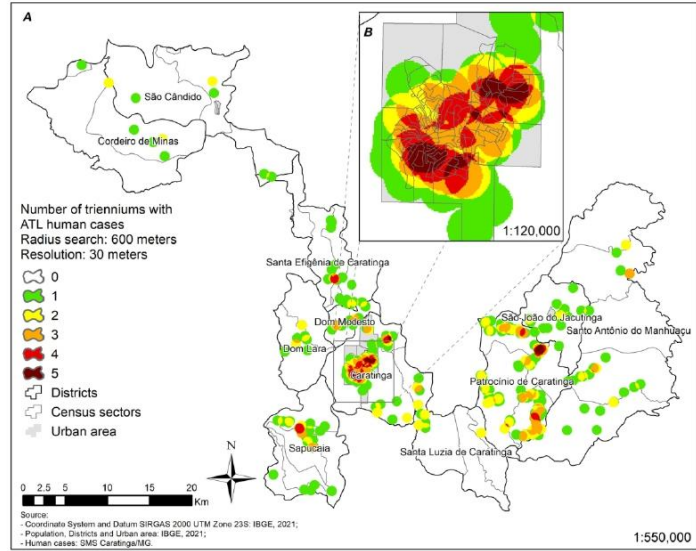


Figure 6. Number of trienniums whit ATL human cases in the municipality of Caratinga (A) and urban area of Caratinga (B).

150x120mm (300 x 300 DPI)



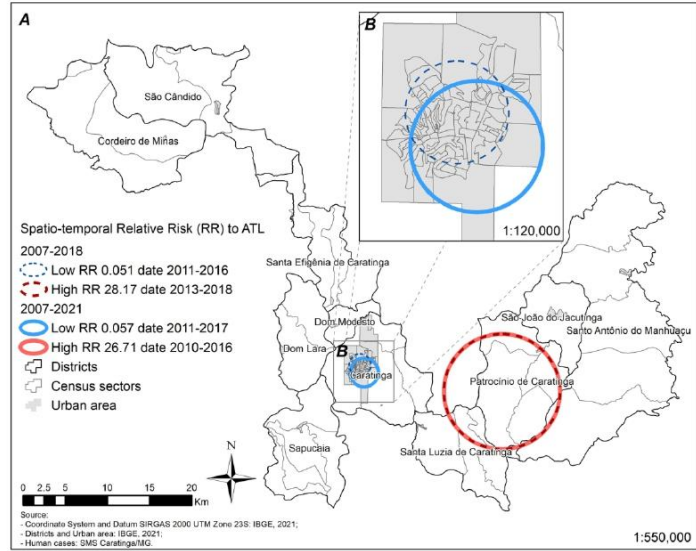


Figure 7. Spatio-temporal Relative Risk to ATL during the period studies in the municipality of Caratinga (A) and urban area of Caratinga (B)  
150x120mm (300 x 300 DPI)

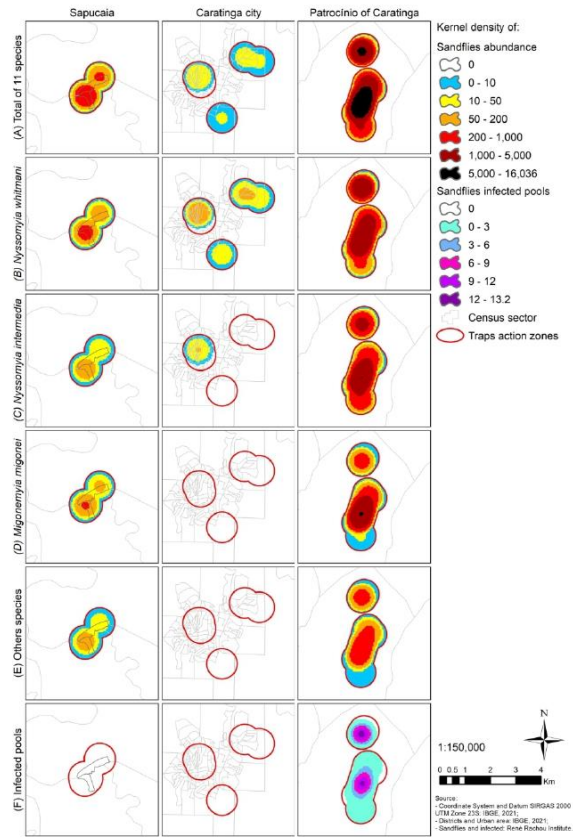


Figure 8. A total of sand flies collected (A), a total of *Ny. whitmani* species (B), a total of *Ny. intermedia* species (C), a total of *Mg. migonei* species (D), a total of others species (E) and a total of sand flies infected pools (F).

150x219mm (300 x 300 DPI)

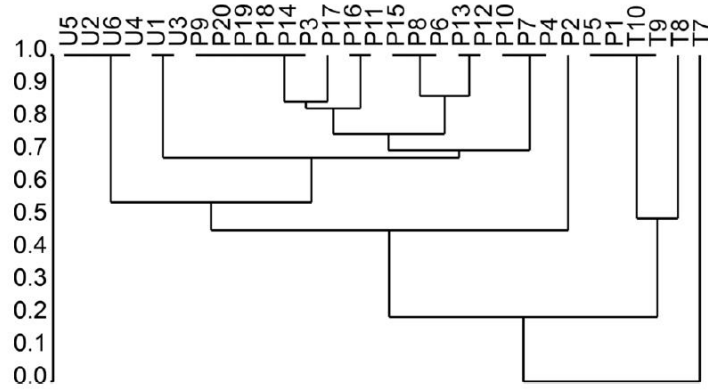


Figure 9. Similarity of sand flies collected in urban area of Caratinga (U1-U6), rural area of Patrocínio de Caratinga district (P1-P20) and transitional area of Sapucaia district (T7-T10).

80x44mm (300 x 300 DPI)

## Anexo 3 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

INSTITUTO RENÉ RACHOU  
FIOCRUZ- MINAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga, Minas Gerais.

**Pesquisador:** Célia Maria Ferreira Gontijo

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 26060619.5.0000.5091

**Instituição Proponente:** Instituição Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas

**Patrocinador Principal:** Instituição Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.997.721

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de análise de resposta apresentada em função de pendências apontadas no Parecer nº 3.920.463 (17/03/2020) emitido no âmbito do projeto de pesquisa "Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga, Minas Gerais", coordenado pela Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo e conduzido no Instituto Rene Rachou em parceria com a SMS de Caratinga-MG.

Resumo: as leishmanioses são doenças parasitárias amplamente distribuídas em países tropicais e subtropicais e sua área de abrangência coincide com o mapa socioeconômico da pobreza pelo mundo. São causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e transmitidos por meio da picada da fêmea de insetos infectados pertencentes à família *Psychodidae*. As leishmanioses podem ser consideradas doenças de extrema complexidade, visto que várias espécies de *Leishmania* são capazes de infectar o homem e diversas espécies de reservatórios e vetores podem estar envolvidos no ciclo de transmissão dos parasitos (AKHOUNDI et al., 2016). O objetivo do presente projeto é analisar aspectos epidemiológicos e a distribuição espacial das leishmanioses na região de Caratinga, Minas Gerais. O desenvolvimento deste estudo permitirá ampliar o conhecimento acerca das leishmanioses em áreas de colonização antiga e compreender melhor os fatores que levam à sua expansão. Além disso, o estudo fornecerá informações importantes sobre a dinâmica de transmissão e o comportamento destas doenças, o que poderá

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

INSTITUTO RENÉ RACHOU  
FIOCRUZ- MINAS



Continuação do Parecer: 3.997.721

ser comparado com dados publicados sobre diversas regiões endêmicas do país. Esperamos também determinar as espécies de Leishmania circulantes na região bem como indicar os possíveis vetores e reservatórios destes parasitos. Em conjunto, os resultados do presente estudo poderão indicar possíveis aplicações do conhecimento da epidemiologia das leishmanioses na região em ações mais efetivas de prevenção e controle.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: analisar os aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga em uma área rural.

Objetivos Secundários:

- Realizar levantamento histórico de dados sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana na região de Caratinga e comparar com o cenário atual;
- Identificar as espécies de flebotômíneos e infecção por Leishmania nas fêmeas coletadas na área de estudo;
- Realizar inquérito sorológico canino na área de estudo;
- Detectar a infecção canina e identificar a espécie de Leishmania;
- Analisar a distribuição espacial de vetores, de casos humanos e caninos de LTA na área de estudo;
- Identificar as áreas de risco de transmissão da LTA na área de estudo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

- Aspirado: dor local, inflamação, risco de infecção e sangramento. Estes fenômenos são transitórios e não acarretam danos ou sequelas para o paciente, além do desconforto momentâneo;
- Biópsia de lesão: Além da dor local e da sensação de desmaio, existe o risco de sangramento expressivo, decorrente da ruptura de um vaso sanguíneo calibroso ou de problemas relacionados à dificuldade de coagulação em pacientes portadores de doença do sistema de coagulação ou que estão em uso de drogas anticoagulantes como a warfarina;
- Outro risco importante é a possibilidade de contaminação dos tecidos por bactérias da pele ou por uso de material contaminado durante o procedimento ou ainda por procedimento inadequado.

Benefícios: A participação no estudo pretende contribuir para o avanço do conhecimento sobre a

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

INSTITUTO RENÉ RACHOU  
FIOCRUZ- MINAS



Continuação do Parecer: 3.997.721

leishmaniose tegumentar e caracterizar seu perfil epidemiológico em Caratinga.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de estudo a ser conduzido em tema relevante para a saúde pública e com equipe capacitada e multidisciplinar. De acordo com a coordenação, o estudo pretende contribuir para o avanço do conhecimento sobre a leishmaniose tegumentar e caracterizar seu perfil epidemiológico em Caratinga, região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados à Plataforma Brasil anteriormente, exceto a carta de anuência da SMS da Prefeitura de Caratinga. Para esta análise foram observados os documentos postados no dia 10/04/2020.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Segue abaixo a análise da resposta apresentada em função das pendências emitidas pelo Parecer nº 3.920.463 (17/03/2020):

- PENDÊNCIA: Anexar regulamento de biorrepositório.

RESPOSTA: As amostras biológicas só serão armazenadas até a análise sendo posteriormente descartadas adequadamente, não sendo retidas. Foi apresentado o regulamento do biorrepositório (Biorrepositorio.pdf).

ANÁLISE: PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

**RECOMENDAÇÕES:**

- a) Como em nenhum documento do estudo foi citada a participação de instituição estrangeira, solicita-se a exclusão do item "Biorrepositório a ser utilizado por instituição estrangeira (se for o caso)";
- b) Os subitens previstos no item "Acordo de gerenciamento de amostras (quando envolver outras instituições) não foram descritos. Solicita-se adequação;
- c) Incluir nova versão deste Regulamento posteriormente, via emenda, devidamente atualizado e

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

INSTITUTO RENÉ RACHOU  
FIOCRUZ- MINAS



Continuação do Parecer: 3.997.721

assinado.

- **PENDÊNCIA:** A maioria das pendências emitidas em relação ao TCLE foram atendidas. Entretanto, as garantias abaixo estavam explícitas no TCLE anterior mas não se encontram na nova versão. Portanto, solicita-se a inclusão das garantias abaixo no texto do TCLE:

- a) Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa em caso de complicações e danos decorrentes, direta ou indiretamente, da pesquisa (Resolução nº 466/12 - IV.3c);
- b) Garantia de ressarcimento e como serão cobertas as despesas tidas pelos participantes da pesquisa e dela decorrentes (Resolução nº 466/12 - IV.3g).

Além disto, solicita-se que a frase abaixo seja alterada para garantir aos indivíduos abordados que eles serão encaminhados ao tratamento mesmo que não aceitem participar no estudo: Última frase do 6º parágrafo do TCLE: "Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo a você e não interferirá no seu atendimento e no seu tratamento médico da leishmaniose." Sugestão de alteração: Mas, se você não aceitar participar no estudo ou sair do estudo a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo a você e não interferirá no seu atendimento e no seu tratamento médico da leishmaniose.

RESPOSTA: foi apresentado nova versão de TCLE (Anexo\_3\_TCLE\_NOVOv2.pdf).

ANÁLISE: PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

RECOMENDAÇÕES: Foi utilizado o termo "sujeito da pesquisa" no campo de assinatura do participante. Este termo deve ser alterado para "participante da pesquisa" de acordo com a definição da Resolução CNS nº 466/2012.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após análise criteriosa, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Diante do exposto, o Comitê de Ética do IRR/FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições a ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. ENTRETANTO, SEM PREJUÍZO À APROVAÇÃO DO

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

**INSTITUTO RENÉ RACHOU  
FIOCRUZ- MINAS**



Continuação do Parecer: 3.997.721

ESTUDO, O COMITÊ SOLICITA O ATENDIMENTO ÀS RECOMENDAÇÕES LISTADAS ACIMA.

Por fim, firma-se, diante deste documento, a necessidade de serem apresentados os relatórios anuais e final, bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1469747.pdf	01/04/2020 16:51:05		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	01/04/2020 16:50:43	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_NOVOv2.pdf	01/04/2020 16:49:03	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo_3_TCLE_NOVOv2.pdf	01/04/2020 16:47:04	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
Outros	MemorandoProjetoCelia.pdf	19/02/2020 10:12:00	Bernadete Patrícia Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo_3_TCLE_NOVO.pdf	18/02/2020 18:18:58	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
Outros	Autorizacao_SMS.pdf	18/02/2020 18:17:28	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_NOVO.pdf	18/02/2020 18:13:56	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	20/11/2019 17:47:29	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
Outros	Anexo_5_Exame_clinico.pdf	20/11/2019 17:43:47	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
Outros	Anexo_4_Entrevista_individual.pdf	20/11/2019 17:43:00	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
Outros	Anexo_2_Oficio_Caratinga.pdf	20/11/2019 17:41:51	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br



**INSTITUTO RENÉ RACHOU  
FIOCRUZ- MINAS**



Continuação do Parecer: 3.997.721

Outros	Anexo_1_Licenca.pdf	20/11/2019 17:40:40	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo_3_TCLE.pdf	20/11/2019 17:38:16	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
Outros	Matriz_de_responsabilidades.pdf	20/11/2019 17:36:20	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	20/11/2019 17:29:43	Célia Maria Ferreira Gontijo	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 29 de Abril de 2020

Assinado por:

**Ana Paula Granato Ribeiro  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

## Anexo 4 – Licença permanente para coleta de material zoológico



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15237-2	Data da Emissão: 29/11/2011 17:39
-----------------	-----------------------------------

#### Dados do titular

Nome: José Dilermando Andrade Filho	CPF: 835.584.546-34
Nome da Instituição: CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, biosspecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

#### Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMILIA	Psychodidae
2		

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	coleção
2	CENTRO DE PESQUISAS RENE RACHOU-FIOCRUZ	coleção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 36646273



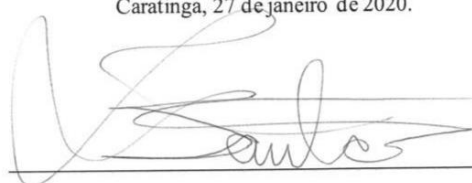
Página 1/2



**Anexo 5A – Autorização da Secretaria de Saúde de Caratinga 2020****PREFEITURA MUNICIPAL DE CARATINGA  
ESTADO DE MINAS GERAIS  
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE****AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA**

Eu, Jaqueline Marli dos Santos, Secretária de Saúde de Caratinga, estou ciente e autorizo a realização da pesquisa intitulada “Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga, Minas Gerais” a ser conduzida juntamente com o Grupo de Estudos em Leishmaniose – Fiocruz Minas, sob responsabilidade da pesquisadora Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo. DECLARO que esta instituição apresenta infraestrutura e os recursos humanos necessários para a realização da referida pesquisa. Esta autorização é válida apenas se houver parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa para o desenvolvimento da mesma.

Caratinga, 27 de janeiro de 2020.



Jaqueline Marli dos Santos  
Secretária Municipal de Saúde  
Prefeitura de Caratinga - MG

**Anexo 5B – Autorização da Secretaria de Saúde de Caratinga 2021**

**PREFEITURA DE CARATINGA  
ESTADO DE MINAS GERAIS  
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE**

**AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA**

Eu, Erick Gonçalves Silva, Secretário de Saúde de Caratinga, estou ciente e autorizo a realização da pesquisa intitulada “Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Caratinga, Minas Gerais” a ser conduzida juntamente com o Grupo de Estudos em Leishmaniose – Fiocruz Minas, sob responsabilidade da pesquisadora Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo. DECLARO que esta instituição apresenta infraestrutura e os recursos humanos necessários para a realização da referida pesquisa. Esta autorização é válida pois há parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa para o desenvolvimento da mesma (PARECER: 3.997.721; CAAE: 26060619.5.0000.5091).

Caratinga, 02 de agosto de 2021.

Erick Gonçalves Silva  
Secretário Municipal de Saúde  
Prefeitura de Caratinga - MG

## Anexo 6 – Termo de sigilo

### TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, **RAFAEL LUIZ DA SILVA NEVES**, brasileiro, casado, servidor público estadual, RG: MG-13.972.485 (SSP-MG), CPF: 075.520.246-58, residente na rua Dr. Maninho, nº 446, aptº 102, centro, Caratinga-MG, considerando:

- O despacho do Exmo. Prefeito Municipal de Caratinga - MG que autorizou o requerimento do compromissário para ter acesso às fichas de notificação de portadores de leishmaniose tegumentar, o qual se baseou no parecer jurídico favorável do assessor jurídico da Saúde, Dr. Francisco de Paula Machado Neto, OAB/MG 113.547, porquanto, foram feitas diversas ponderações a respeito do sigilo de informações das referidas fichas
- A necessidade e o ganho na realização da pesquisa a ser desenvolvida pelo compromissário em favor do Município, pois, é certo que os órgãos públicos e demais entes dispõem, na maioria dos casos, de informações que podem contribuir para avanço de pesquisas que irão proporcionar informações que serão úteis para coibir o avanço de enfermidades com relação à gravidade das manifestações clínicas que algumas formas de leishmaniose apresentam;
- A previsão legal quanto ao acesso às informações, tal seja, no art. 102, inciso IV, da LOM, e, ainda, as disposições da Lei Federal nº 8.159/1991, que dispõe sobre política nacional de arquivos, porquanto, garantem o acesso às informações requeridas, onde o pesquisador/compromissário foi devidamente certificado da responsabilidade quanto ao zelo e cuidado sobre as informações repassadas pela Administração Pública.


Concordo em assumir toda a responsabilidade, tendo em vista o disposto no art. 102, inciso IV, da LOM, e, ainda, as disposições da Lei Federal nº 8.159/1991, que dispõe sobre política nacional de arquivos, porquanto, garantem o acesso às informações requeridas.

Pelo exposto, assino em duas vias de igual teor e forma, na presença das testemunhas abaixo arroladas, o presente termo de compromisso para guardar sigilo absoluto das informações repassadas pelo Departamento de Epidemiologia da Secretaria Municipal de Saúde de Caratinga, sob pena de responder cível e criminalmente.

Declaro, ainda, estar ciente de que a inobservância do compromisso assumido neste documento me obriga a ressarcir todos os danos causados para o Município de Caratinga.

Este Termo de Compromisso e Responsabilidade é expressão da verdade e por ele respondo integralmente.

Caratinga-MG, 13 de fevereiro de 2019.

  
Rafael Luiz da Silva Neves  
Compromissário

Testemunhas:

1). 

2). 

## Anexo 7 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### ESTUDO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MUNICÍPIO DE CARATINGA, MINAS GERAIS.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa desenvolvida por pesquisadores desta instituição em colaboração com a Secretaria de Saúde de Caratinga. Este documento visa esclarecê-lo sobre a pesquisa que será realizada, detalhando todos os procedimentos e os benefícios e riscos envolvidos. Por favor, leia as informações com atenção e fique à vontade para esclarecer todas as suas dúvidas.

#### Dados do participante da pesquisa

Nome: \_\_\_\_\_

Documento de identidade: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

#### Informações sobre a pesquisa:

Esta pesquisa será desenvolvida pelo Instituto René Rachou em parceria com a Secretaria de Saúde de Caratinga. As coletas dos materiais para a pesquisa serão feitas na Policlínica Municipal de Caratinga pela médica responsável pelo serviço Dra Pollyana Anarely Pinto Lucas, CRM MG: 52661.

Todos os indivíduos que aceitarem participar da pesquisa serão convidados para a realização dos procedimentos do estudo: entrevista individual, realização de exame clínico e coleta de amostras das lesões sugestivas de leishmaniose cutânea.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_ Rubrica do participante: \_\_\_\_\_