

Cláudio Júlio da Silva

Eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar em áreas de colonização antiga na
região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil.

Universidade Fernando Pessoa

Porto- Portugal

2023

Cláudio Júlio da Silva

Eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar em áreas de colonização antiga na
região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil.

Universidade Fernando Pessoa

Porto- Portugal

2023

III

Cláudio Júlio da Silva

“TODOS DIREITOS RESERVADOS”

Cláudio Júlio da Silva

Eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar em áreas de colonização antiga na região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil.

Atesto a originalidade do trabalho

Tese apresentada à Universidade Fernando Pessoa-UEP, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ecologia e Saúde Ambiental, sob a orientação da Professora Doutora Cláudia Sofia de Assunção Gonçalves e Silva e a co-orientação da Doutora Maria Edileuza Felinto de Brito.

RESUMO

CLÁUDIO JÚLIO DA SILVA: Eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar em áreas de colonização antiga na região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil.

(Sob a Orientação da Professora Doutora Cláudia Silva e Coorientação da Doutora Maria Edileuza Felinto de Brito)

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é considerada uma doença dermatológica de grande importância para Saúde Pública. No Brasil, há registros de casos autóctones em todos os estados do país e Pernambuco apresenta 30% de prevalência. O objetivo do estudo foi avaliar o ciclo de transmissão da doença através da eco-epidemiologia da LT em área de colonização antiga (com notificação de casos autóctones), através da identificação dos casos autóctones, caracterização da fauna de flebotomíneos, reservatórios domésticos e identificação da(s) espécie(s) de *Leishmania* envolvida(s). Participaram do estudo 168 pacientes suspeitos de LT e 272 animais domésticos, todos de área endêmica do Município do Moreno-PE. Ambos os grupos eram de sexo, raças e idades variadas. Os animais pertenciam às espécies *Canis familiares* (212), *Felis catus* (21), *Equus caballus/Equus asinus* (33), *Capra aegagrus hircus* (5) e *Ovis aries* (1). Foram realizadas capturas de flebotomíneos no intra e peridomicílio. A idade da amostra humana estudada variou entre os 5 e os 74 anos, sendo a maioria do sexo masculino, pardos, profissionalmente ativos, com o nível de escolaridade baixo. Dos 85 pacientes submetidos ao raspado de borda de lesão, 25,6% dos esfregaços foram positivos para LT e 34 isolados foram identificados como *L. (Viannia) braziliensis*, espécie circulante na região. A confirmação de casos humanos por PCR foi estatisticamente significativa. O teste Kappa foi realizado na PCR para medir o índice de concordância entre as amostras de biópsia e swab de lesão com o valor de 60,8% e $p < 0,001$. Dos 272 animais domésticos estudados, 168 eram machos e 104 fêmeas. Dentre esses, 31 apresentavam lesões, 29 eram cães, um gato, uma ovelha e todos foram positivos pela qPCR. Foram capturados 239 espécimes de flebotomíneos e identificados de acordo com Young e Ducan como *Lu. whitmani* (99,6%) e *Lu. evandroi* (0,4%). Dentre as fêmeas de *L. whitmani* 92,6% (n=60), estavam infectadas

com *Leishmania (V.) braziliensis* detectadas por qPCR. Esses resultados mostraram que a principal lacuna relacionada a eco-epidemiologia da LT, associada à *Leishmania (V.) braziliensis* é a identificação de hospedeiros reservatórios e flebotomíneos envolvidos no ciclo de manutenção da doença.

Palavras-chave: Eco-epidemiologia, diagnóstico laboratorial e clínico, leishmaniose tegumentar, leishmaniose cutânea, *Leishmania (V.) braziliensis*.

ABSTRACT

CLÁUDIO JÚLIO DA SILVA: Eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis in areas of ancient colonization in the metropolitan region of Recife, Pernambuco, Brazil.

(Under the orientation of Profa. Dra. Cláudia Silva and the co-orientation of Profa. Dra.

Maria Edileuza Felinto de Brito)

Cutaneous Leishmaniasis (CL) is considered a major dermatological disease of great importance for Public Health. In Brazil, there are records of autochthonous cases in all states in the country, and Pernambuco has a 30% prevalence. The aim of the study was to evaluate the disease transmission cycle through the eco-epidemiology of CL in an area of ancient colonization (with notification of autochthonous cases), through the identification of autochthonous cases, characterization of the sand fly fauna, domestic reservoirs, and identification of the *Leishmania* species involved. One hundred and sixty-eight patients suspected of CL and 272 domestic animals participated in the study, all from an endemic area of the county of Moreno-PE. Both were of varying sex, races, and ages. The animals belonged to the *Canis familiar* species (212), *Felis catus* (21), *Eqqus caballus/Eqqus asinus* (33), *Capra aegagrus hircus* (5) and *Ovis aries* (01). Sand flies were captured inside and outside the home. The range age of the human population studied was between 5 and 74 years, with most of the male, brown skin, professionally active and with low education. From the 85 patients who underwent scraping of the edge of the lesion, 25.6% of the smears were positive for CL and 34 isolates were identified as *L. (Viannia) braziliensis*, a circulating species in the region. Confirmation of human cases by PCR was statistically significant. The Kappa test was performed using PCR to measure the concordance index between biopsy and lesion swab samples, with the value of 60.8% and $p < 0.001$. From the 272 domestic animals studied, 168 were male and 104 females. Among these 31 had lesions, 29 were dogs, one cat, one sheep and all were positive by qPCR. 239 specimens of sand flies were captured and identified according to Young and Ducan as *L. whitmani* (99.6%) and *L. evandroi* (0.4%). Among females of *L. whitmani*, 92.6% (n=60) were infected with

Leishmania (V.) braziliensis detected by qPCR. These results showed that the main gap related to TL eco-epidemiology associated with *Leishmania (V.) braziliensis* is the identification of the reservoir hosts and sand flies involved in the disease maintenance cycle.

Keywords: Eco-epidemiology, laboratorial and clinical diagnosis, tegumentary leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis, *Leishmania (V.) braziliensis*.

RÉSUMÉ

CLÁUDIO JÚLIO DA SILVA: Eco-épidémiologie de la leishmaniose tégumentaire dans les zones de colonisation ancienne de la région métropolitaine de Recife, État de Pernambuco, Brésil.

(Sous la supervision du Profa. Dra. Cláudia Silva et la co-supervision du Profa. Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito)

La leishmaniose tégumentaire (LT) est considérée comme une maladie dermatologique de grande importance pour la santé publique. Au Brésil, il y a des enregistrements de cas autochtones dans tous les états du pays et Pernambuco a une prévalence de 30%. L'objectif de cette étude était d'évaluer le cycle de transmission de la maladie à travers l'éco-épidémiologie de la LT dans une zone de colonisation ancienne (avec notification des cas autochtones), par l'identification de cas autochtones, la caractérisation de la faune de phlébotomes, les réservoirs domestiques et l'identification de la ou des espèces de *Leishmania* impliquées. Ont participé à l'étude 168 patients suspectés de LT et 272 animaux domestiques, tous issus de la zone endémique de la municipalité de Moreno-PE. Les deux étaient de sexe, de race et d'âge variés. Les animaux appartenaient aux espèces *Canis familiaris* (212), *Felis catus* (21), *Equus caballus/Equus asinus* (33), *Capra aegagrus hircus* (5) et *Ovis aries* (1). Des captures de phlébotomes ont été réalisées dans l'intra et le péri-domicile. L'âge de l'échantillon humain étudié allait de 5 à 74 ans, et la majorité était de sexe masculin, brun, actif professionnellement, avec un faible niveau d'éducation. Sur les 85 patients soumis à un écouvillonnage du bord des lésions, 25,6 % des écouvillons étaient positifs pour la LT et 34 isolats ont été identifiés comme étant *L. (Viannia) braziliensis*, une espèce circulant dans la région. La confirmation des cas humains par PCR était statistiquement significative. Le test de Kappa a été réalisé sur la PCR pour mesurer l'indice de concordance entre les échantillons de biopsie et d'écouvillonnage des lésions avec une valeur de 60,8 % et un $p < 0,001$. Sur les 272 animaux domestiques étudiés, 168 étaient des mâles et 104 des femelles. Parmi eux, 31 présentaient des lésions, 29 étaient des chiens, un chat, un mouton et tous étaient positifs par qPCR. Un total de 239 spécimens de phlébotomes ont été capturés et identifiés selon Young et Ducan comme *Lu.*

whitmani (99,6%) et *Lu. evandroi* (0,4%). Parmi les femelles de *L. whitmani* 92,6% (n=60), étaient infectées par *Leishmania (V.) braziliensis* détecté par qPCR. Ces résultats montrent que la principale lacune liée à l'éco-épidémiologie de la LT, associée à *Leishmania (V.) braziliensis* est l'identification des hôtes réservoirs et des phlébotomes impliqués dans le cycle d'entretien de la maladie.

Mots clés : Eco-épidémiologie, diagnostic de laboratoire et clinique, leishmaniose tégumentaire, leishmaniose cutanée, *Leishmania (V.) braziliensis*.

“Obstáculos difíceis de serem superados são os que mais demandam tempo, paciência e persistência. Nenhum obstáculo é impossível de ser vencido. É tudo uma questão de força de vontade!”

Alex Verly

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus filhos Jhon Ewerton e Júlia Mikaella, que são a fonte de minha energia, e aos meus pais: Maria Júlio da Silva e José Amaro da Silva (*In memoriam*) pelos ensinamentos, amor e carinho que a mim foram dados.

AGRADECIMENTOS

- A Deus por sua presença constante em minha vida;
- A todos os meus Professores do doutoramento pela sua contribuição ao passar o conhecimento que contribuiu para construção desta tese;
- À minha orientadora Professora Doutora Cláudia Sofia de Assunção Gonçalves e Silva pela valiosa orientação, permitindo a realização deste trabalho, e amizade conquistada;
- À minha coorientadora Doutora Maria Edileuza Felinto de Brito, pela nossa amizade, carinho, generosidade, compromisso e preciosa coorientação para o desenvolvimento de todo o trabalho;
- Aos meus filhos Jhon e Júlia, pelo carinho, compreensão e força nos momentos mais difíceis durante todo o estudo;
- A Paulo Sérgio pelo apoio, força e incentivo durante toda a trajetória do doutoramento;
- Às colegas Samara, Karina, Érika, Andreia pelo apoio técnico durante o desenvolvimento desse trabalho;
- Ao amigo Fernando pelo apoio técnico durante a captura dos flebotomíneos;
- À Doutora Juliana, pelo incentivo, colaboração e organização deste material;
- Ao Diretor do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães Doutor Sinval P. Brandão Filho por permitir o desenvolvimento deste trabalho no Departamento de Imunoparasitologia;
- À Dra. Ângela Rapela pela anamnésia realizada com dedicação a cada paciente.
- Ao Dr. Felipe Dantas, pelo apoio técnico na identificação taxionômica dos ectoparasitas coletados dos animais domésticos pertencentes a este estudo;
- Ao Núcleo de Vigilância em Saúde do município do Moreno, Pernambuco, pelo apoio dado à realização deste trabalho;
- Ao Professor Nelson Barros, coordenador do doutoramento, pela capacidade administrativa e pedagógica;
- Aos pacientes e populações dos Engenhos Jardim e Cumaru, pelo sentimento de colaboração para o desenvolvimento deste estudo;

- A todos os colegas de turma pela amizade conquistada;
- À Universidade Fernando Pessoa por ter proporcionado a realização desse sonho.

ÍNDICE

	Pág.
Lista de figuras e gráficos	xvii
Lista de tabelas	xx
Lista de abreviaturas e símbolos	xxii
1. Introdução	1
2. Justificativa	7
3. Hipótese	9
4. Objetivos	11
5. Revisão bibliográfica	13
6. Material e métodos	34
7. Resultados	65
8. Discussão	81
9. Conclusão	91
10. Referências bibliográficas	93
Anexos	124

LISTA DE FIGURAS E DE GRÁFICOS

Figuras e gráficos	Pág.
Figura 1. Distribuição de casos novos de leishmaniose cutânea em todo o mundo (2018).	3
Gráfico 1. Números de casos de LT no Brasil, referente ao período de 2003 a 2018.	4
Gráfico 2. Número de casos novos de LTA no período de 2003 a 2018 no Estado de Pernambuco, Brasil.	5
Gráfico 3. Número de casos novos de LTA no período de 2003 a 2018 no Município do Moreno, Pernambuco, Brasil.	6
Figura 2. (A). <i>Leishmania</i> - forma promastigota; (B). <i>Leishmania</i> – forma amastigota.	17
Figura 3. Ciclo biológico de flebotomíneo do gênero <i>Lutzomyia</i>	19
Figura 4. Ciclo de transmissão da Leishmaniose visceral e LT	22
Figura 5: (A) LT- Lesão ulcerada franca, única, pequena, com bordas elevadas, infiltradas, com hiperemia ao seu redor e fundo granuloso no membro superior esquerdo. (B) Lesão ulcerada, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltrado e fundo granuloso localizado no membro inferior direito.	23
Figura 6. (A) LT- Recidiva cútis. (B) Lesão cutânea múltipla, pequenas disseminadas (152 lesões).	24
Figura 7. LT- (A) Forma cutânea difusa (LCD)-Lesões infiltradas com áreas descamativa na orelha (tempo de doenças 12 anos). (B) Lesão vegetante extensa no nariz e nódulo infiltrativo na face (tempo de evolução 8 anos).	24
Figura 8. (A). Leishmaniose mucosa; (B): Leishmaniose mucosa com destruição do septo nasal.	25
Figura 9. Vista panorâmica do Município de Moreno-PE.	35
Figura 10. Localização do Município de Moreno no Estado de Pernambuco.	36
Figura 11. Municípios limites com o Município de Moreno.	36

Figura 12. Fragmento de Mata Atlântica (Mata da Onça), ambiente modificado. Engenho Jardim Moreno-PE.	38
Figura 13. Residência próxima ao fragmento da Mata da Onça.	39
Figura 14. Residência próxima ao fragmento de Mata Atlântica (Mata da Onça) e plantação de cana-de-açúcar	40
Figura 15. Fragmento de Mata Atlântica preservada (Reserva Carnijó/RPPN) Moreno-PE.	40
Figura 16. Plantação de banana próxima de residência existente no Engenho Jardim.	41
Figura 17. (A) Reserva Carnijó (B) Plantação de cana-de-açúcar no Engenho Jardim	41
Figura 18. (A e B) Vista panorâmica do Engenho Cumaru.	42
Figura 19. Avaliação clínica e coleta de material biológico.	44
Figura 20. Escarificação das bordas da lesão com lâmina de bisturi para pesquisa direta.	45
Figura 21. Aspirado na borda da lesão.	46
Figura 22. (A) Biópsia da borda da lesão. B. <i>Punch</i> utilizado na coleta de amostras por biópsia.	47
Figura 23. Coleta de sangue utilizando o sistema a vácuo.	48
Figura 24. Coleta com uso de <i>swab</i> na borda da lesão.	48
Figura 25. Recipiente para dispensar a saliva humana.	49
Figura 26. Coleta de sangue em caprino (A e B), cão (C) e equino (D).	50
Figura 27. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).	51
Figura 28 (A e B). Coleta da secreção ocular na conjuntiva com o <i>swab</i> em equino e cães.	51
Figura 29. Instalação de armadilha tipo CDC no intradomicílio.	52
Figura 30. Instalação de armadilha do tipo CDC para captura de flebotomíneos no peridomicílio (A e B) estábulo, (C) galinheiro.	53
Figura 31. (A, B e C). Instalação de armadilha do tipo CDC para captura de flebotomíneos em plantações de bananas no Engenho Jardim.	54

Figura 32. Remanescente de Mata Atlântica (Mata da Serra) localizada no Engenho Cumaru (A) . Instalação de armadilha do tipo CDC nas bordas da Mata (B) .	55
Figura 33 (A e B). Instalação da armadilha CDC no interior da Mata.	56
Figura 34. Pontos de captura de flebotomíneos.	57
Figura 35. Identificação da forma amastigota de <i>Leishmania</i> sp em microscopia óptica	58
Figura 36. Teste Rápido Qualitativo (TR DPP®) para a detecção em cães de anticorpos específicos para a <i>Leishmania</i> .	59
Gráfico 4. Distribuição dos pacientes de acordo com a localidade, do município de Moreno, de onde são provenientes.	66
Figura 37. (A) Cão com LTA mucocutânea com destruição do focinho; (B) Gato e (C) Ovelha com lesão de LTA na orelha.	76
Gráfico 5. Variação de flebotomíneos capturados e da pluviometria no ano de 2017, em Moreno.	79
Gráfico 6. Variação de flebotomíneos capturados e da pluviometria no ano de 2018, em Moreno.	79

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Pág.
Tabela 1. Distribuição da população entre zona urbana e rural. Município de Moreno-PE, 2010.	38
Tabela 2. Distribuição da população por gênero entre a zona urbana e rural. Município de Moreno-PE, 2010.	38
Tabela 3. Classificação clínica, epidemiológica e laboratorial da amostra de casos confirmados com LT.	67
Tabela 4. – Resultados dos exames laboratoriais em amostras humanas.	68
Tabela 5. Caracterização da amostra de casos com suspeita de LT de acordo com o diagnóstico e respectivo risco de positividade e intervalo de confiança a 95%.	69
Tabela 6. Tipos de amostras biológicas em casos humanos com suspeita de LT e resultados da PCR.	70
Tabela 7. Distribuição dos animais domésticos por sexo de acordo com a espécie.	71
Tabela 8. Distribuição dos animais domésticos por porte de acordo com a espécie.	71
Tabela 9. Características físicas gerais dos animais domésticos.	72
Tabela 10. Tabela 10. Características clínicas I dos animais domésticos.	73
Tabela 11. Características clínicas II dos animais domésticos.	74
Tabela 12. Razão de prevalência relativa ao risco do animal ter infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i> , medida pelo resultado da qPCR.	75
Tabela 13. Resultados de qPCR para detecção de <i>Leishmania</i> spp em amostra de sangue, de <i>swab</i> da conjuntiva ou <i>swab</i> da lesão de animais domésticos.	76
Tabela 14. Resultado do qPCR em função da existência, ou não, de lesão cutânea compatível com LT.	77

Tabela 15. Comparação de positividade entre diferentes amostras biológicas de animais domésticos.	78
Tabela 16. Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados com armadilha CDC nos Engenhos Jardim e Cumaru no município do Moreno-PE, no período de 2017 a 2018.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APAC - Agências Pernambucana de Águas e Clima

BOD - *Biochemical Oxygen Demand (BOD)*

CEUA – Comissão de Ética de Utilização de Animais

CL – Forma cutânea localizada

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IAM – Instituto Aggeu Magalhães

IDRM – Intradermorreação Montenegro

IMIP – Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LD – Forma cutânea disseminada

LIMP – Laboratório de Imunoparasitologia

LM – Leishmaniose mucocutânea

LRC – Leishmaniose recidiva cútis

LT – Leishmaniose tegumentar (em inglês: CL – *Cutaneous leishmaniosis*; em francês:

LT – *Leishmaniose tégumentaire*)

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS- Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em cadeia de polimerase.

qPCR – Reação em cadeia de polimerase em tempo real

RC – Forma recidiva cútis

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

RNA - Ácido ribonucleico

SUS – Sistema Único de Saúde

TAE – Tampão tris–acetato

TR DPP – Teste Rápido Qualitativo *Dual Path Platform*

°C – Graus celsius

mm³ – Milímetros cúbicos

% - Porcentagem

≥ - Maior ou igual



1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nas Américas, as leishmanioses são causadas por diversos protozoários do gênero *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, transmitidas por diferentes espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. A leishmaniose tegumentar (LT) é uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas), o ser humano adquire a infecção ao entrar em contato com áreas florestais onde existem as enzootias, através de processos migratórios, urbanizações desordenadas, mas existem fatores de riscos individuais, como co-infecção com HIV (vírus da imunodeficiência humana), que podem contribuir para a expansão do agravo (Basano, Camargo, 2004).

A doença apresenta uma variedade de manifestações clínicas dependentes da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro, desde formas mais brandas com lesões discretas de pele, que tendem a cura espontânea, a ulcerações múltiplas ou lesões de curso lento e difícil tratamento, ou mesmo a forma visceral mais grave (Silveira & Barbosa, 1996; Medeiros, Roselino, 1999).

As leishmanioses são endêmicas em 98 países, constituído doenças parasitárias de maior importância, consideradas prioritárias pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Figura 1). A incidência anual é de 1 a 1,5 milhões de casos de LT e 500.000 casos de leishmaniose visceral, enquanto que 350 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção e o número estimado de pessoas infectadas é de 12 milhões. A incidência da LT no Brasil tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (Gráfico1). Entre 2003 e 2018 foram notificados 350.578 casos novos (DATASUS, 2020).

A LT é a forma da doença que mais se encontra distribuída em todo mundo, sendo que em 2019, cerca de 87% dos casos ocorreram no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irão, Iraque, Líbia, Paquistão, Síria e Tunísia. Estima-se que entre 600.000 a 1 milhão de novos casos ocorrem anualmente no mundo inteiro (Alvar et al., 2012; World Health Organization, 2019; Morais, 2015).

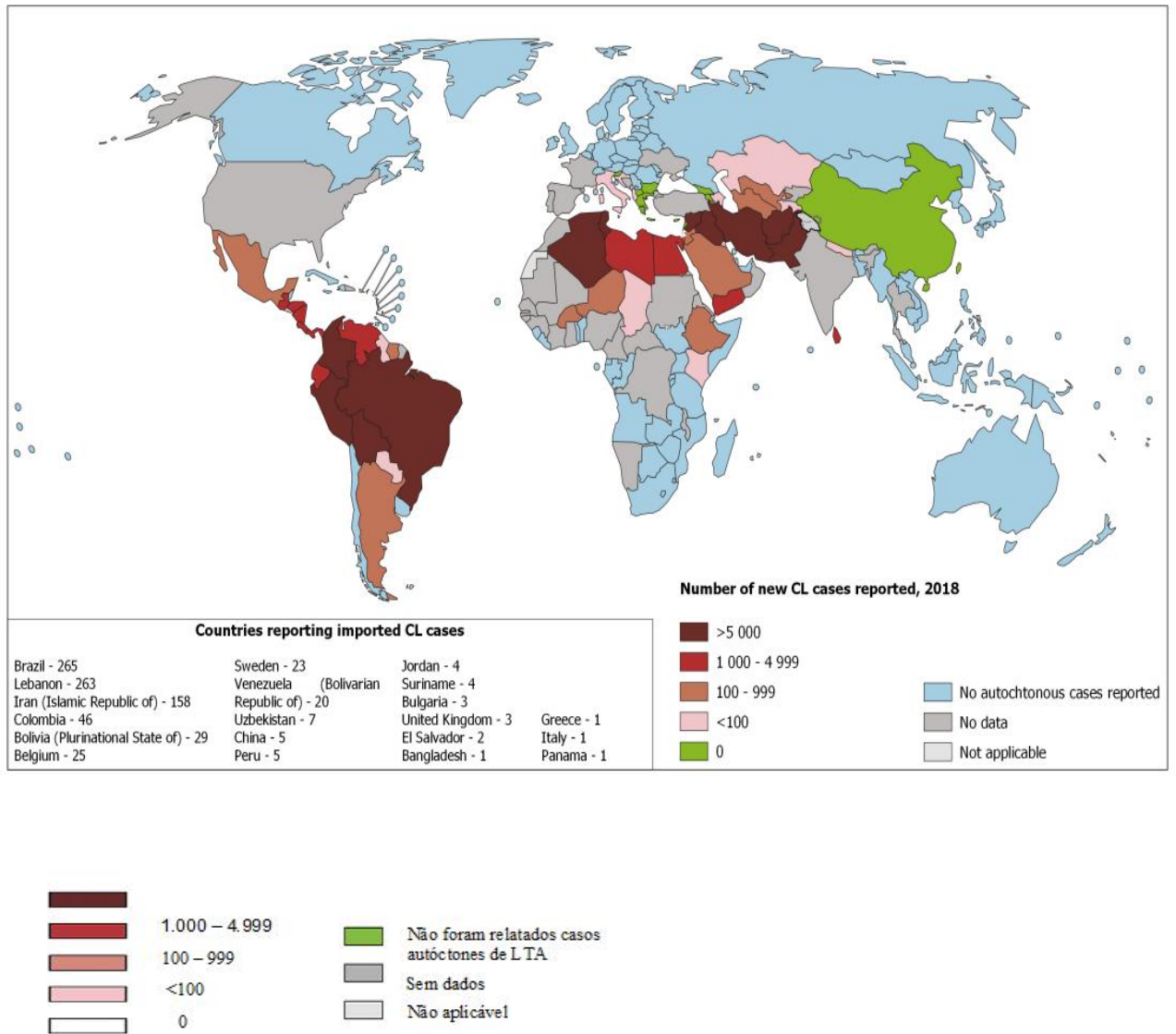


Figura 1. Distribuição de casos novos de leishmaniose cutânea em todo o mundo (2018).

Fonte: World Health Organization (2018).

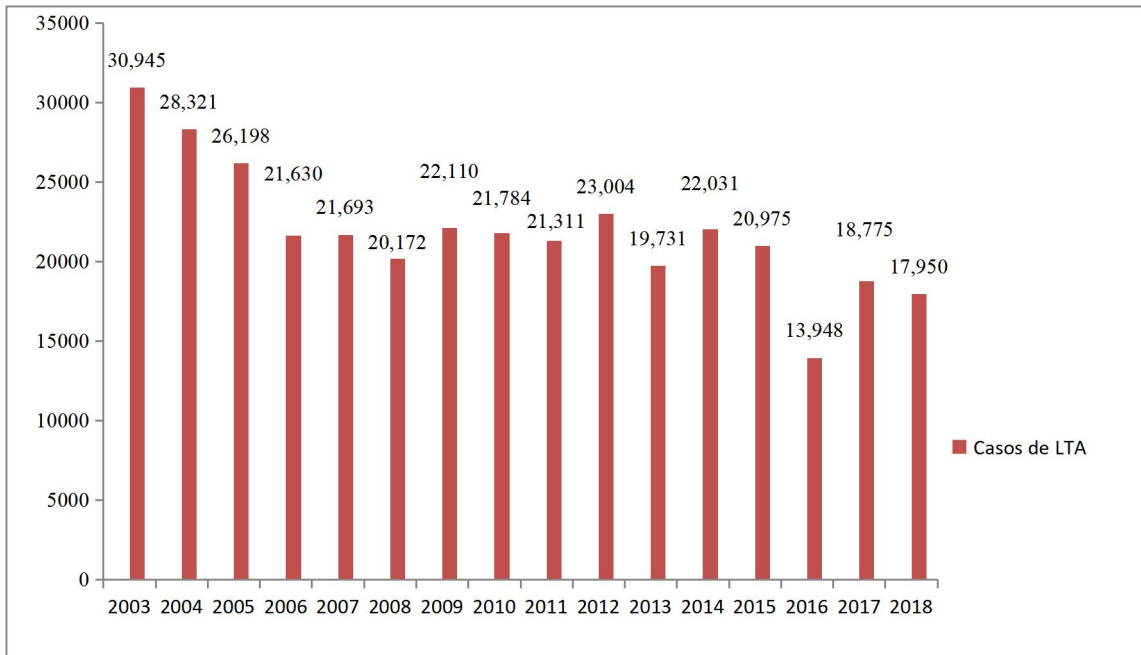


Gráfico 1. Número de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil, referente ao período de 2003 a 2018.

Fonte: DATASUS (2020).

Na região Nordeste do Brasil, a incidência da LT ocorre tanto nas áreas com resquícios de floresta da Mata Atlântica, com vegetação abundante, como nas áreas com predominância de mata secundária e diversos tipos de plantações, propícias à colonização dos flebotomíneos e mamíferos silvestres e sinantrópicos. Onde se tem observado a adaptação de vetores e reservatórios a ambientes modificados, com transmissão peridomiciliar (Marzochi, 1992).

Em estudos realizados no município de Três Braços na Bahia, região cacauceira com resquícios de Mata Atlântica, a *Lutzomyia whitmani* foi identificada como vetor envolvido na transmissão da doença (Vexenat, et al., 1986). Já na região serrana de Baturité, Ceará, a principal espécie envolvida na transmissão florestal foi *Lu. welcomei* (Ready, Ribeiro, 1983). Já no peridomicílio *Lu. whitmani* e *Lu. migonei* estariam associados a esta transmissão (De Queiroz, et al., 1994).

Em Amaraji, Zona da Mata Sul de Pernambuco foi verificado que a espécie *Lu. whitmani* seria o vetor principal envolvido nos ciclos enzoótico e zoonótico de

transmissão desta endemia na região (Brandão-Filho, et al., 1994; Brandão-Filho et al., 2003). Investigações recentes no município de Moreno também revelaram a predominância de *Lu. whitmani* em área endêmica da doença reforçando de facto que essa espécie é um importante vetor de *L. (V.) braziliensis* em Pernambuco (Brito et al., 2008; 2009; 2012; 2018).

Das sete espécies associadas à doença em humano, *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais importante pela maioria dos casos de LT no país e a principal em Pernambuco (Brasil, 2007; Brito et al., 2009; 2018; Brandão-Filho et al., 2003). Neste Estado, a persistência e o aumento do número de casos tem revelado distintos padrões no ciclo de transmissão, tornando-se nos últimos anos um importante problema de saúde pública (Brandão-Filho et al., 1999; Andrade et al., 2005; Brito et al., 2012). Cerca de 60% do total dos casos registrados no Estado são oriundos da Zona da Mata, com notificações de 3.268 casos entre o período de 1990 a 2000 e 4.361 durante o período de 2003 a 2012 (Gráfico 2) (BRASIL, 2006; BRASIL, 2012). Um estudo conduzido em uma população de 481 indivíduos no município de Moreno através do teste de Montenegro relata 30% positividade, dentre esses 67% não tinha história de LT (Brito et al., 2008). Durante o período de 2003 a 2018 o Núcleo de Vigilância do município notificou 435 casos novos da doença (Gráfico 3).

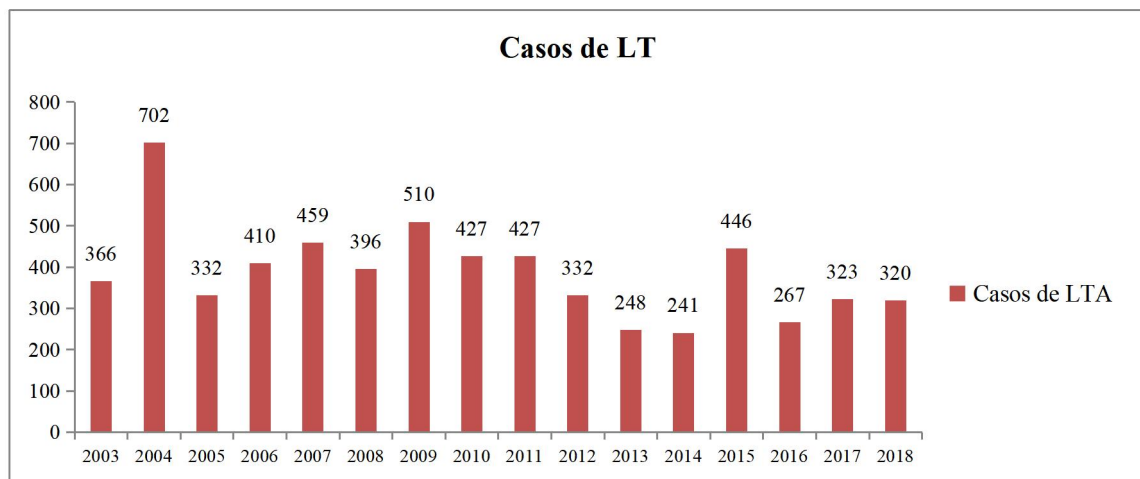


Gráfico 2. Número de casos novos de leishmaniose tegumentar americana no período de 2003 a 2018 no Estado de Pernambuco, Brasil.

Fonte: DATASUS (2020).

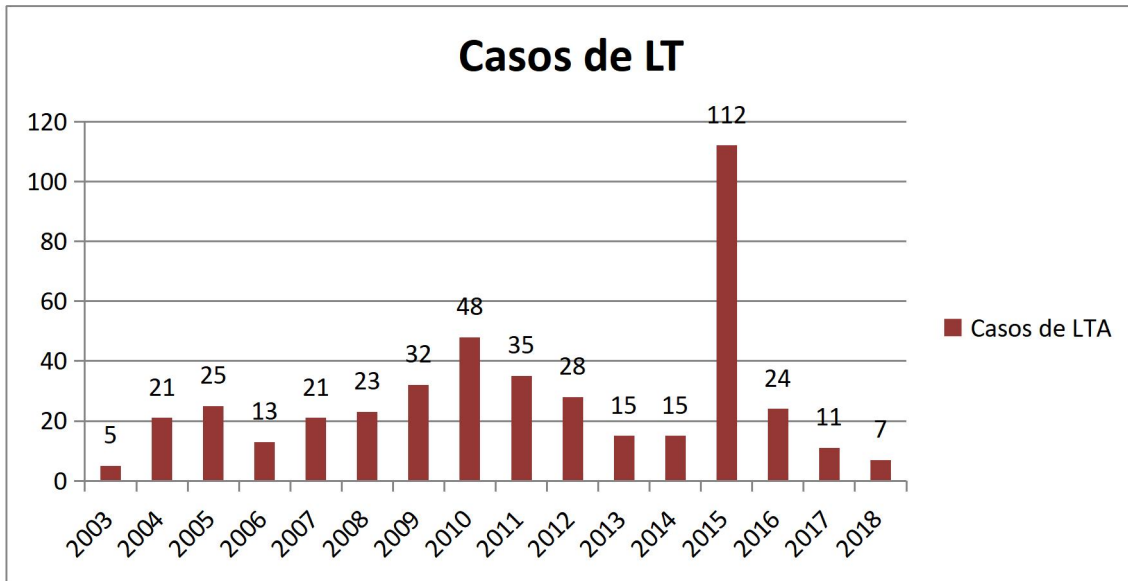


Gráfico 3. Número de casos novos de leishmaniose tegumentar americana no período de 2003 a 2018 no Município do Moreno, Pernambuco, Brasil.

Fonte: DATASUS, (2020).

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A LT incide em todas as regiões de Pernambuco, inclusive na Região Metropolitana do Recife que, até recentemente, não se verificavam casos autóctones (Brito et al., 2012). O município de Moreno, situado na Região Metropolitana do Recife registrou 112 casos autóctones em 2015. De acordo com o Núcleo de Vigilância em Saúde do município, esse número vem aumentando, em média, de 52 casos ao ano (Brito et al., 2012).

Estudos sobre a epidemiologia da doença demonstraram que, até ao momento, o principal agente etiológico presente no ciclo de transmissão da LT na população humana e hospedeiros reservatórios (animais silvestres e sinantrópicos) em Pernambuco é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, espécie causadora da forma mais grave da doença (Brito et al., 2009; 2018). Além disso, *Lutzomyia witmani* é o flebotomíneo (vetor) envolvido na transmissão da LT na Zona da Mata no Estado, com mais de 98% de predominância das espécies capturadas e identificadas na fauna flebotomínica (Brandão-Filho et al., 1998; Andrade, 2005; Brito et al., 2008; Andrade, 2010).

Infecções por *Leishmania. spp* que causam a LT, também são registrados em animais domésticos (canídeos, equídeos, felídeos). Embora o seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não tenha sido definitivamente elucidado, esses animais participam na manutenção da endemia sendo considerados hospedeiros acidentais (Brasil, 2007; Brasil, 2017).

Estudos realizados através de inquéritos com aplicação do teste de Montenegro, nas populações dos Engenhos Jardim e Carnijó no ano de 2000 e posteriormente no Engenho Pinto, em 2008, localizados no município de Moreno – PE apresentaram 22,4% e 30%, respetivamente, de prevalência da doença (Brito et al., 2008).

Por isto, justifica-se plenamente o estudo da fauna de flebotomíneos e a frequência da infecção em animais domésticos e humanos, que contribuirá para um melhor conhecimento do ciclo de transmissão da LT, possibilitando um melhor planeamento e implementação de medidas de controle da doença na região.

3.HIPÓTESE

3. HIPÓTESE

O ciclo de transmissão da LT no município de Moreno ocorre no ambiente (peri) doméstico, onde flebotomíneos e animais domésticos (canídeos, equinos, felinos e ovídeos e caprinos) participariam na manutenção da endemia.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Estudar a eco-epidemiologia da LT em área de colonização antiga, através da identificação dos casos autóctones da doença, caracterização da fauna de flebotomíneos vetores, reservatório doméstico e identificação da (s) espécie (s) de *Leishmania* envolvida(s).

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência da LT em habitantes do município de Moreno, Pernambuco-Brasil;
- Identificar a distribuição temporal e espacial dos casos humanos e a expressão clínica;
- Estudar as espécies e densidade de flebotomíneos nas áreas onde ocorreram casos autóctones;
- Verificar a dinâmica sazonal e a distribuição das principais espécies de flebotomíneos;
- Determinar a frequência da infecção por *Leishmania* spp. em cães;
- Identificar a(s) espécie(s) de *Leishmania* circulantes em pacientes humanos, flebotomíneos e animais domésticos (canídeos, equinos, felinos e ovídeos).

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1. Aspectos gerais da leishmaniose tegumentar

A LT é uma enfermidade ocasionada por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae*, apresentando várias formas clínicas. As manifestações clínicas ocasionadas pela LT ocorrem dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida no ciclo de transmissão da doença (Lainson & Shaw, 1978; Weigle & Saraiva, 1996), das espécies de vetores, da imunidade do paciente, da genética, da relação com o hospedeiro e de aspectos epidemiológicos (Brandão-Filho et al., 1999).

As manifestações clínicas da LT vão desde a forma inaparente ou surgimento de lesão de pele que muitas vezes pode evoluir para uma cura espontânea ou o aparecimento de lesão única, múltiplas ou mucocutânea, sendo a última, a forma mais grave da doença podendo ocasionar a destruição parcial ou total da pirâmide nasal, comprometendo assim toda a via respiratória (Coutinho et al., 1987; Passos et al., 2001; Brasil, 2007).

5.2. Breve histórico epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil

Relatos e descrições em literatura definem a LT como uma enfermidade da Antiguidade, que vem acompanhando o ser humano desde o século I d.C. Nas Américas, 400 a 900 anos d.C., índios Peruanos já representavam a doença em humanos em cerâmicas, onde os retratavam sem nariz, caracterizando a forma mais grave da doença denominada mucocutânea, podendo as *Leishmania spp.* perfurar e provocar destruição do septo nasal e, na boca, a destruição do palato mole. Essa deformidade estigmatizante contribui para a baixa auto-estima, interferindo no âmbito psicossocial do indivíduo (Lainson, 1997; Camargo, 2003; Brasil, 2010). Posteriormente, em estudos de paleomedicina, foram encontradas múmias com lesões cutânea e mucocutânea, caracterizando a LT (Santos & Coimbra, 1994). A primeira descrição da LT no Brasil foi no ano de 1827, encontrada no documento da Pastoral

Religiosa Político-Geográfica, mencionado no livro de Tello intitulado “*Antiguidad de la Syphilis en el Peru*”, onde ele descreve a viagem de Tabatinga (Amazonas) até ao Peru, realizada pelo Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros. Percurso realizado nos vales das regiões amazônicas (Paraguassu-Chaves, 2001).

5.3. Agente etiológico

São protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório, heteroxênico, responsáveis por diversas manifestações clínicas da LT em todas as regiões do mundo, sendo encontrada com mais frequência na população de África, América Latina, Ásia do Sul e Central, bacia do Mediterrâneo e no Médio Oriente (Desjeux, 1999; Gontijo, 2003). A reprodução ocorre por bipartição e quanto à morfologia: promastigota, de forma alongada e flagelada (Figura 2A), encontrada parasitando o tubo digestório do flebótomo. No entanto, a forma cilíndrica e aflagelada (Figura 2B) se encontram parasitando e causando lesões ulceradas única, múltiplas e mucosas no ser humano e nos animais domésticos (cães, gatos e equinos) (Rey, 2010; World Health Organization, 2015).

Sete espécies de *Leishmania* foram descritas no Brasil pertencentes ao subgênero *Viannia* e *Leishmania* causadoras da LT, as espécies são: *L. (V) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindebergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Brasil, 2007; Brasil, 2017). São distribuídas em todas as regiões, com registro de casos em todas as Unidades Federadas. Em geral a transmissão está relacionada com atividades profissionais agrícolas realizadas nas regiões endêmicas, no cultivo da cana-de-açúcar, cacau e banana (Brandão-Filho et al., 2003; Marzochi, 1992).

A *Leishmania (V) braziliensis* é a espécie mais importante não só no Brasil, mas em toda a América Latina, com ampla distribuição desde a América Central até o norte da Argentina. Foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita como agente etiológico da LT e causadora da forma mais grave da doença, que acomete a região nasofaríngea. Essa espécie é mais frequente em áreas de colonização antiga e em ambiente modificado (Marzochi, 1992; Basano & Camargo, 2004; Coelho, 2010; Brito, 2013).

A *Leishmania (V.) guyanensis* é a espécie encontrada na região norte do rio Amazonas, que tem como reservatório natural os desdentados marsupiais. Essa espécie de *Leishmania* é causadora de ulcerações simples ou múltiplas com metástase ao longo do trajetos linfáticos; não causa a forma mais grave da doença a mucocutânea (Brasil, 2017).

A *Leishmania (V.) naiffi* agente da doença cuja forma clínica são lesões que cicatrizam de forma benigna. O seu reservatório natural é o tatu. É encontrada nos Estados do Pará e Amazonas (Brasil, 2017).

A *Leishmania (V.) shawi* é a espécie encontrada nos Estados do Pará e Amazonas, responsável por casos esporádicos de lesões cutâneas. Os seus reservatórios naturais são diversos animais silvestres tais como macacos, bichos-preguiças e outros animais do grupo dos procionídeos (Brasil, 2017).

A *Leishmania (V.) lainsoni* foi assinalada na região da Amazonas. Incriminando como reservatório natural do agente etiológico a paca, mamífero do gênero *Cuniculus* (Brasil, 2017).

A *Leishmania (V.) lindebergi* foi descrita pela primeira vez ao infectar militares que desenvolviam atividades em floresta degradada no Estado do Pará no norte do Brasil (Brasil, 2017).

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é o agente etiológico responsável pela forma difusa, tendo como principais reservatórios naturais os marsupiais e roedores silvestres. Encontrada nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (Dunaisk, 2006; Brasil, 2017; Brito, 2013).

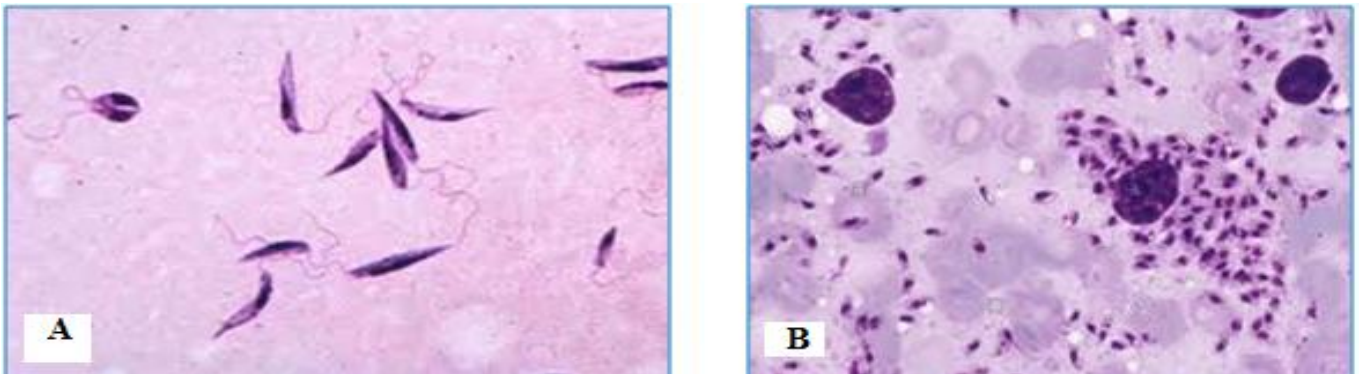


Figura 2. (A). *Leishmania*- forma promastigota; (B). *Leishmania* – forma amastigota
Fonte: Brasil, (2010).

5.4. Vetores

Os vetores pertencem à ordem díptera, subordem Nematocera - hematófago - da família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*, constituída pelos gêneros: *Phlebotomus* (Rondani, 1840), *Sergentomyia* (França & Parrot, 1920), *Chinius* (Leng, 1987) no Velho Mundo e *Lutzomyia* (França, 1924), *Brumptomyia* (França & Parrot, 1921) e *Warileya* (Hertig, 1948) no Novo Mundo (Young & Duncan, 1994). Nas Américas, existem mais de 500 espécies de vetores da LT, sendo o gênero *Lutzomyia* o mais representado, com mais de 400 espécies catalogadas, constituídas por 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e 2 espécies com descrição insuficiente. Os vetores pertencentes a esse gênero apresentam uma vasta distribuição geográfica no Novo Mundo e são encontrados dos Estados Unidos ao Norte da Argentina (Costa, 2011).

Os flebotomos são holometábolos, apresentam metamorfose completa que vai desde o ovo (eclodem geralmente de 7 a 10 dias após a postura), seguindo a sequência: larva, pupa e adulto (Figura 3). Após a cópula, as fêmeas de flebotomíneos procuram locais adequados no solo, onde haja substrato húmido e com elevado teor de matéria orgânica para colocar os seus ovos e garantir uma alimentação adequada para as larvas. Quando adulto, o macho se alimenta de carboidratos, e as fêmeas tanto de carboidratos

quanto de sangue. Portanto, são consideradas hematófagas. O repasto sanguíneo é importante para a maturação dos ovos (Forattini, 1973).

No Novo Mundo pouco se conhece sobre os criadouros naturais dos flebotomos durante a fase jovem. Nos ambientes domésticos são encontrados em fendas das paredes, chão e porões. No entanto no peridomicílio, na fase jovem são encontrados em latrinas, aterros, debaixo de pedras e em tocas abandonadas de animais. No ambiente silvestre, são encontrados em tocas de roedores, locas nas pedras, buracos em troncos de árvores, formigueiros, cavernas (Feliciangeli, 2004; Costa, 2011).

Grande diversidade de espécies de flebotomíneos são encontradas nos vários biomas Pernambucanos, tais como a Caatinga e os remanescentes de Mata Atlântica. A Caatinga é um bioma cuja a temperatura varia entre 25° C a 29° C, solo seco, pedregoso, as secas são cíclicas e prolongadas (Souza et al., 2014; Saraiva et al., 2015). E cuja fauna flebotomínica apresenta grande variedade de espécies vetoras das leishmanioses tais como *Lutzomyia longipalpis*, responsável pela transmissão da leishmaniose visceral, que se encontra adaptada nas regiões semiáridas (Dantas-Torres et al., 2010; Costa, 2011).

A *Lu whitmani* é a principal espécie transmissora da *Leishmania braziliensis* que causa LT e encontra-se em abundância em ecótopos do intra e peridomicílio no Estado de Pernambuco e nos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná (Rangel & Lainson, 2009; Brandão-Filho, 2011). Ainda, em Pernambuco, existem outras espécies como a *Lu. complexa*, *Lu. choti* e *Lu. sordelli* que são predominantes em resquícios de Mata Atlântica e participam, também, do ciclo de transmissão da doença (Dantas-Torres et al., 2010).

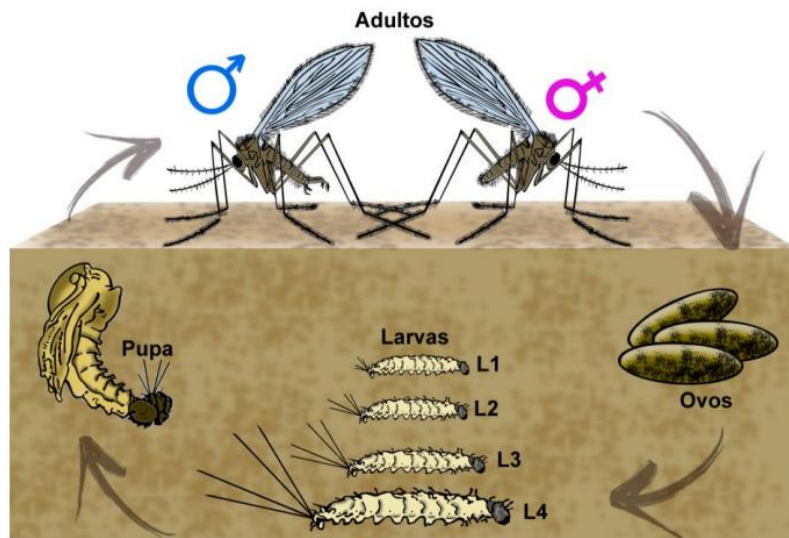


Figura 3. Ciclo biológico de flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*

Fonte: Sousa, RLT (2018).

5.5. Hospedeiros e Reservatórios

Algumas espécies de roedores, edentados, marsupiais e canídeos silvestres foram identificados como possíveis hospedeiros e reservatórios naturais (Brasil, 2010). Roedores silvestres e sinantrópicos dos gêneros *Akodon* (Forattini et al., 1972), *Proechimys* (Lainson & Shaw, 1973), *Rattus* (Lainson & Shaw, 1979; Brandão-Filho et al., 1994; Vasconcellos et al., 1994) *Oryzomys* (Forattini, 1972; Lainson & Shaw, 1969; Forattini et al, 1973) *Rhipidomys* (Lainson et al., 1981), são considerados os principais hospedeiros e reservatórios naturais da *L. (V) braziliensis*.

As espécies de roedores *Nectomys squamipes* (rato d'água), *Bolomys (=Necromys) lasiurus* (rato do mato) (Brandão-Filho et al., 2003) e marsupiais do gênero *Didelphis*, também são os principais responsáveis pela manutenção do ciclo de transmissão da doença (Lainson & Shaw, 1973).

São considerados reservatórios da LT as espécies de vertebrados que garantam a circulação de *Leishmanias* spp. na natureza dentro de um recorte de tempo e espaço

(Brasil, 2010). Em função das constantes modificações ambientais, a interação hospedeiro-parasito, se torna cada vez mais complexa, formando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança (Marinho-Júnior, 2015).

5.5.1. Animais domésticos

Os animais domésticos podem estar infectados pelo agente etiológico da leishmaniose tanto no Novo quanto no Velho Mundo. O aparecimento com frequências dos animais infectados no peridomicílio das residências onde há a presença de flebotomíneos, levaram diversos pesquisadores a estudar a importância desses animais na eco-epidemiologia da doença. Contudo, a maioria dos estudos estão mais focados na leishmaniose visceral visto que, essa doença, pode levar o indivíduo ao óbito (Madeira et al., 2003; Serra et al., 2003; Zanzarini et al., 2005; Pittner et al., 2009).

Os animais domésticos são considerados hospedeiros acidentais da LT, e podem apresentar manifestações clínicas semelhantes às dos humanos. As *Leishmania* spp. podem parasitar mucosas e chegar, muitas vezes, a comprometer as vias aerodigestivas superiores do paciente acometido com a doença (Brito, 2013; Marinho Júnior, 2015).

No Brasil, o cão (*Canis familiaris*) considerado o melhor amigo do homem, é o principal reservatório da leishmaniose visceral ocasionada pelo parasita da espécie *Leishmania infantum*. Na LT há relatos de cães com infecção natural por *Leishmania braziliensis* (Madeira et al., 2003; Heuser et al., 2010).

Também há evidência de casos esporádicos da doença no gato doméstico (*Felis catus*), no Brasil. Em algumas regiões do mundo, tais como: na África (Argélia, Ilha de Reunião), Ásia (Irã, Vietname e Irão), na Europa (Espanha, Portugal, Itália, França e Suíça) e nas Américas (Estados Unidos, Venezuela e Argentina), o gato doméstico foi encontrado infectado por espécies de *Leishmania* por via natural (Mello, 1940; Figueiredo et al., 2009; Bresciani, et al, 2010; Pirajá et al., 2013).

Em várias regiões do Brasil, espécies de equinos: cavalos (*Equus caballus*), jumentos (*Equus asinus*) e mulas híbridas, resultantes do cruzamento de uma fêmea (*Equus caballus*) e um macho de (*Equus caballus*), também têm sido encontrados naturalmente infectados com *L. (V) braziliensis* (Alencar et al., 1959; Falqueto, 1986; Aguiar, 1986; Cruz et al., 1989; Reithinger et al., 2003; Soares, 2013).

Há escassez de estudos com bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*), caprinos (*Cabra aegagrus hircus*), ovinos (*Ovis aries*) e porcos (*Sus scrofa domesticus*), pouco se conhecendo sobre o seu papel na epidemiologia da LT, no Brasil. Existem poucos relatos de casos por infecção natural desses animais domésticos por *Leishmania* spp. Entretanto, no ano de 1987 no município de José do Ribamar no Estado do Maranhão, foi diagnosticado um suíno infectado com *Leishmania* sp, em lesão ulcerada na orelha, esse animal residia na casa de um dos pacientes com LT (Brazil et al., 1987).

5.6. Ciclo de transmissão e período de incubação

A transmissão de *Leishmania* spp, ocorre através da picada da fêmea infectada do flebotomíneo durante a hematofagia. Ao deglutir os parasitas encontrados no tecido epitelial ou no sangue periférico, a forma amastigota se transforma na forma promastigota, sendo albergada no sistema digestório das espécies vetoras da LT, que se multiplicam através de divisão binária ou bipartição, migrando em seguida para probóscida, onde ficarão até à próxima hematofagia. Ao realizar o segundo repasto, inocula na corrente sanguínea dos vertebrados a forma flagelada do protozoário, infectando-os. O parasita é fagocitado pelos macrófagos e no seu interior se transforma na forma amastigota (forma aflagelada) que se multiplica por bipartição. Os macrófagos em seguida se rompem, liberando inúmeros parasitas que continuam infectando outros macrófagos mais próximos mantendo a infecção (Figura 4) (Killick-Kendrick, 1977; Beach, Kiillu, Leeuwenburg, 1985; Aguiar, 1986; Brito, 2013).

O período de incubação, em média, é de dois a três meses em humanos, podendo haver variação de duas semanas até dois anos até ao surgimento da lesão. A transmissibilidade da LT não se dá de pessoa para pessoa (Brasil, 2010). Contudo, há relatos de casos de contaminação por acidentes ocupacionais (Brito et al., 2012).

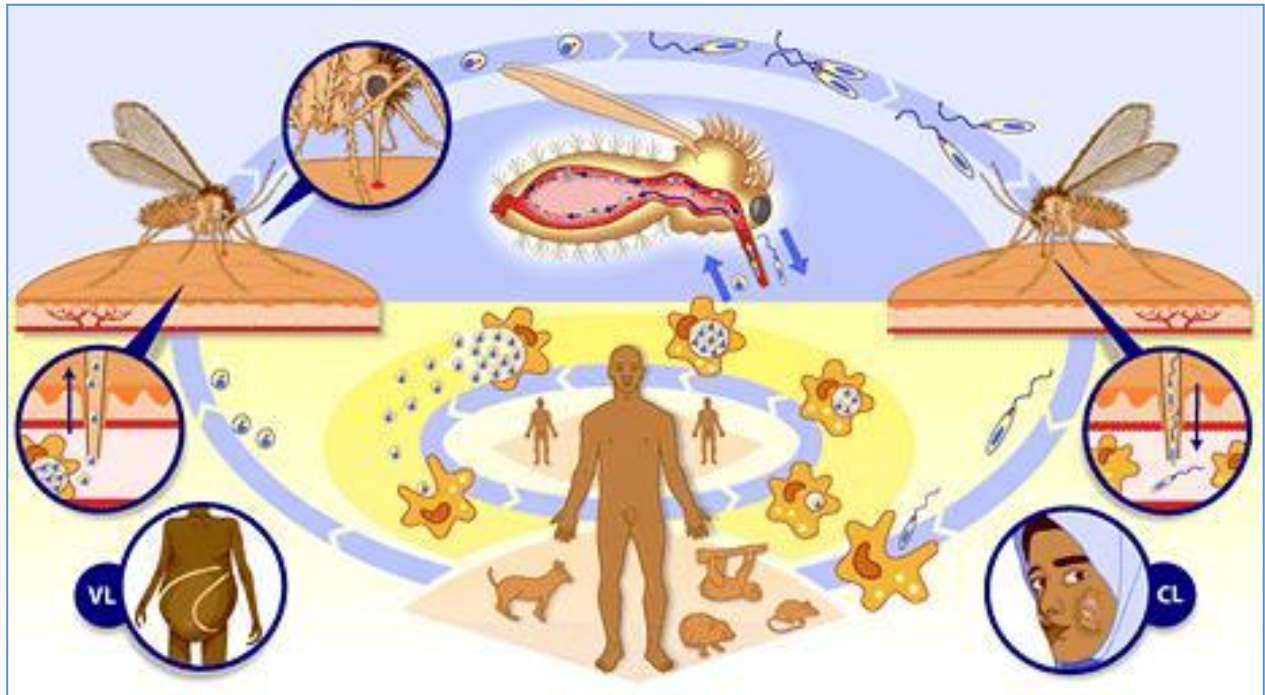


Figura 4. Ciclo de transmissão da leishmaniose visceral e da LT [na figura: VL corresponde a leishmaniose visceral e CL corresponde a LT]

Fonte: World Health Organization, (2015)

5.7. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar

As manifestações clínicas da LT dependem da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação com o hospedeiro, do sistema imunológico do indivíduo e sua constituição genética, das espécies vetoras responsáveis pelo ciclo da transmissão e das características epidemiológica (Lainson & Shaw, 1978; Weigle & Saraiva, 1996; Barral & Sampaio, 1991; Reis et al., 2008; Brandão-Filho et al., 1999). A LT apresenta diversas formas de manifestações clínicas:

5.7.1. Forma cutânea localizada (CL): lesão única ou múltipla, ulcerada com fundo granulomatoso, bordas elevadas com ou sem presença de exsudado, podendo apresentar de 1-20 lesões com tamanhos variados que pode(m) evoluir para cura espontânea (Costa et al., 2009; Goto, Lindoso, 2012) (Figuras 5 A e B).

5.7.2. Forma recidiva cútis (RC): surgem na região lisa da lesão primária cicatrizada lesões satélites após o indivíduo ter concluído o tratamento da doença, obtendo uma cura clínica e não parasitária. A persistência da *Leishmania* na lesão e a baixa imunidade do hospedeiro, contribuem para o surgimento dessa forma da doença (Schubach et al., 1998; Mendonça et al., 2004; Brito, 2013) (Figura 6A).

5.7.3. Forma cutânea disseminada (LD): descrita em 1986; é uma forma clínica rara, encontrada em 2% dos casos diagnosticados. Pesquisas realizadas sobre informações do comportamento parasitológico e imunológico contribuem para a expressão clínica da doença. A *Leishmania (V) braziliensis* e a *Leishmania (L) amazonensis* são as principais espécies responsável pelo surgimento dessa forma clínica da LT (Brasil, 2007; Brito, 2013). As lesões têm aspectos acneiformes, múltiplas em forma de pápula, podendo acometer diversas partes do organismo como face e tronco. Naturalmente, no indivíduo, poderá iniciar com diversas úlceras de bordas elevadas com fundo granulomatoso. Adenomegalia satélite pode ser encontrada em 50% da forma localizada, na maioria das vezes ausente na forma disseminada ou aparentemente de forma discreta. As lesões primárias surgem por disseminação do agente etiológico, por via hemática ou linfática, e durante as 24 horas seguintes poderão surgir lesões afastadas da picada do flebotomíneo (Guimarães et al., 2005; Brasil, 2010) (Figura 6B).



Figura 5. (A) LT - Lesão ulcerada, única, pequena, com bordas elevadas, infiltradas, com hiperemia ao seu redor e fundo granuloso no membro superior esquerdo. **(B)** Lesão ulcerada, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso localizada no membro inferior direito.

Fonte: autor (2018).



Figura 6. (A) LT- recidiva cutis.(B) Lesão cutânea múltipla, pequenas e disseminadas (152 lesões). Fonte: Brito MEF, (2013).

5.7.4. Forma cutânea difusa (LCD): É uma enfermidade ocasionada pelo agente etiológico *L. amazonensis*, que se inicia de forma insidiosa com evolução lenta. No local da picada do flebotomíneo, surge uma única lesão com formação de placas, e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimdo amplas extensões cutâneas, apresentando uma má resposta ao tratamento quimioterápico. A LCD é uma doença rara, porém muito grave que possui uma resposta imune celular deficiente aos antígenos de *Leishmania* spp. A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é negativa nessa forma clínica da doença (Desjeux, 2004; Costa et al., 2009) (Figura 7 A e B).

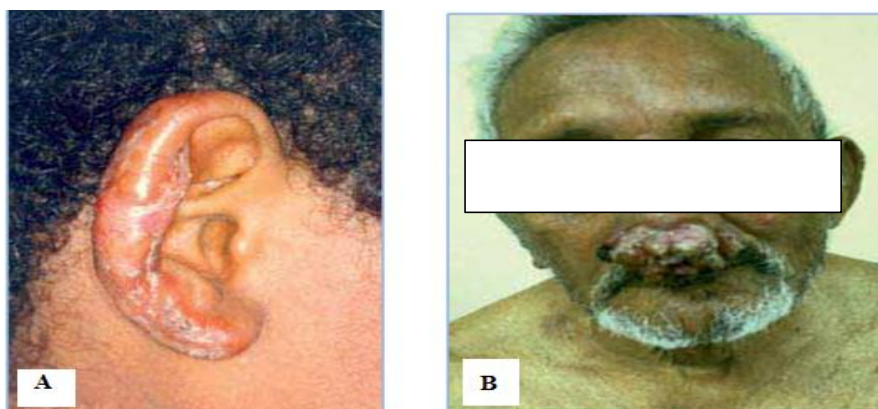


Figura 7. LT- (A) Forma cutânea difusa (LCD)-Lesões infiltradas com áreas descamativa na orelha (tempo de doenças 12 anos). (B) Lesão vegetante extensa no nariz e inóculo infiltrativo na face (tempo de evolução 8 anos). Fonte: Brasil, (2010).

5.7.5. Forma mucosa ou mucocutânea (LM): Em geral surge após a cura clínica da leishmaniose cutânea, não apresentando sintomatologia. De 3 a 5% dos casos de LT evolui para lesão mucocutânea decorrente de uma forma crônica da doença curada sem a realização de tratamento ou de um tratamento realizado de forma inadequada. A LM apresenta lesões que podem destruir cartilagem e mucosa, as quais podem comprometer as vias aéreas superiores. Os indivíduos que apresentam LC por um período de um ano ou mais duração, com localização acima da cintura são indivíduos com maiores possibilidades de desenvolverem metástases para LM. A maioria dos pacientes a quem clinicamente e laboratorialmente, são diagnosticados com LM apresentam cicatrizes primárias que indicam anteriormente ter tido a LC. Outros não apresentam cicatriz indicativa, mas apresentam concomitantemente lesões cutâneas e mucosas. A lesão é indolor e, em muitos casos, ocorre na semimucosa localizando-se na região labial podendo-se iniciar no septo nasal anterior. A LM dissemina-se por via linfática ou hematogênica através do processo de metástase (Goto, Lindoso, 2010) (Figura 8. A e B).



Figura 8 (A). Leishmaniose mucosa

Fonte: Brito MEF, (2013)

Figura 8 (B). Leishmaniose mucosa com destruição do septo nasal.

Fonte: o autor, (2019)

5.7.5.1. As formas clínicas da leishmaniose mucosa são classificadas em: forma mucosa tardia, mucosa de origem indeterminada, mucosa concomitante, mucosa contígua e mucosa primária.

Forma mucosa tardia: considerada uma forma da doença mais comum. O seu aparecimento surge após vários anos a cicatrização da forma LC. A LM é uma enfermidade dermatológica de duração longa, que está associada à LC de múltiplas lesões ou uma lesão que teve um longo processo na cicatrização ou quando o tratamento não foi realizado de forma eficaz ou, até mesmo, em pacientes que tiveram cura espontânea.

Forma mucosa de origem indeterminada: é uma manifestação clínica em que não há evidência que o paciente tenha tido a forma cutânea, portanto, a LM apresenta-se isoladamente. Esta forma pode estar associada às infecções subclínicas, ou pequenas lesões não ulceradas de rápida evolução, que não deixaram cicatrizes e que passaram clinicamente despercebidas (Brasil, 2005; Brasil, 2010).

Forma mucosa concomitante: O paciente apresenta, ao mesmo tempo, lesão mucosa e uma lesão cutânea ativa porém apresentando certa distância entre as lesões (Brasil, 2005; Brasil, 2010).

Forma mucosa contígua: lesão localizada na face próxima dos orifícios do nariz e da boca, chegando a propagar-se para a mucosa das vias aerodigestivas. Durante o diagnóstico a lesão cutânea pode apresentar-se cicatrizada ou de forma ativa (Brasil, 2005; Brasil, 2010).

Forma mucosa primária: a mucosa ou semimucosa de lábios e genitálias são comprometidas ocorrendo, eventualmente, através da picada do flebotômíneo (Brasil, 2005; Brasil, 2010).

5.7.6. Diagnóstico diferencial

A LT assemelha-se a diversas doenças de pele como: esporotricose, hanseníase virchoviana, sífilis terciária, carcinoma epidermóide, linfomas, entomoftromicose, paracoccidiodomicose, sarcoidose, rompimento do septo nasal por uso de drogas, rinite alérgica, carcinoma basocelular, rinofina, rinosporidiose, sinusite, granulomatose de Wegner entre outras enfermidades mais raras, por isso recomenda fazer o respectivo diagnóstico diferencial (Salles, 2004).

O diagnóstico é feito através da avaliação clínica, dados epidemiológicos e laboratoriais. Desta forma, o diagnóstico epidemiológico pode ter como base os dados e relatos das áreas endêmicas com a presença de casos de LT em humanos e animais e a evidência de espécies de flebótomos na região. O diagnóstico clínico faz-se com a observação da lesão, o que nem sempre é fácil devido ao fato da LT poder ser confundida e apresentar semelhanças com outras doenças dermatológicas (Gontijo, Carvalho, 2003).

5.7.7. Aspectos clínicos em animais domésticos

Em animais domésticos as lesões da LT são encontradas em orelhas, focinho ou saco escrotal. A lesão pode ser única ulcerada e, eventualmente, podem ser encontradas lesões múltiplas. Doenças como neoplasias, micoses e especialmente a esporotricose são zoonoses em que as lesões se assemelham com a LT (Brasil, 2010).

5.8. Diagnóstico laboratorial para leishmaniose tegumentar

O diagnóstico laboratorial ocorre através da presença do parasito no material biológico coletado. Os métodos utilizados como ferramenta para diagnóstico podem ser: 1) parasitológicos [pesquisa direta, isolamento em cultura *in vitro* (em meios de cultura), isolamento *in vivo* (com inoculação em animais)]; 2) histopatológico (análise de fragmentos adquiridos das bordas da lesão através de biópsia); 3) imunológicos (intradermoreação de Montenegro); 4) sorológicos [reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), *western blotting*]; 5) moleculares [reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR quantitativa em tempo real (qPCR)] (Brito, 2012; Brito, 2013).

5.8.1. Diagnóstico parasitológico

a) Pesquisa Direta

Este método, de rápida execução e de baixo custo, é considerado a referência ou padrão ouro (*gold standard*) no diagnóstico da LT. Contudo, apresenta limitações como a baixa sensibilidade e a impossibilidade de distinção de espécies de *Leishmania*. A escassez do parasito nas lesões poderá levar a obtenção de um resultado falso negativo e a positividade está relacionada com o tempo de evolução da doença (Marzochi, 1992; Bensoussan et al., 2006; Brito, 2013).

A pesquisa direta é eficaz em pacientes com leishmaniose difusa, pois nos nódulos ocasionados pela doença presentes no tecido epitelial são encontrados grandes quantidades de parasitos como a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Ao contrário das lesões causadas pela espécie de *L. (V) braziliensis*, que são pobres em formas amastigotas (Cuba, et al., 1981; 1986; Gontijo, 2003; Brito, 2013).

b) Isolamento em cultivo *in vitro* (meios de cultura) e *in vivo* (inoculação em animais)

O isolamento de parasito em cultura de material obtido por biópsias e aspirado de borda de lesões é muito específico, contudo, apresenta baixa sensibilidade. Isto devido à contaminação e variação de meios de culturas na manutenção do parasito *in vitro*. Outra forma de diagnóstico parasitológico é o isolamento *in vivo*, no qual as amostras são inoculadas em hamster (*Mesocricetus auratus*), animal susceptível. Estes métodos permitem a confirmação e posterior identificação da espécie de *Leishmania* envolvida (Bensoussan et al., 2006; Rodriguez-González et al., 2006).

5.8.2. Histopatológico

O fragmento do tecido pode ser processado através de técnicas histológicas convencionais. A identificação do parasito nesse material pode revelar outros

patógenos, além das leishmanioses, como fungos e bactérias, o que permite o diagnóstico diferencial de outras doenças inflamatórias ou neoplasias. Sendo assim, o aspecto histopatológico da LT consiste em um infiltrado mononuclear misto, apresentando granulomas tuberculóide (Sotto et al., 1989). O encontro do parasito de *Leishmania* depende da forma clínica e evolução da doença. Esse material pode, ainda, ser utilizado pela técnica de histoquímica (Goto, 2010). Ambas as técnicas não são utilizadas em rotina de diagnóstico, pois necessitam de infraestruturas e de pessoas especializadas.

5.8.3. Testes imunológicos

Intradermoreação Montenegro

A IDRM é um teste de hipersensibilidade tardia utilizado para confirmação da LT em indivíduos que apresentam lesões ativas, em inquéritos epidemiológicos nas localidades endêmicas, em diagnóstico retrospectivo ou em pacientes que obtiveram cura espontânea. Apresenta alto nível de sensibilidade (>90 %), sendo útil nos casos em que, nas lesões ulceradas, não são encontradas a presença do parasito. É muito frequente encontrar reatividade ao teste na população que se encontra em regiões de alta endemicidade. A IDRM apresenta reações cruzadas com outras doenças tropicais, principalmente com a doença de Chagas, leishmaniose visceral, esporotricose, tuberculose, hanseníase vichorwiana, cromomicose, entre outras. Apresenta resultados falso-negativos quando a leishmaniose é a LCD ou quando ocorre a infecção de forma precoce com seis semanas ou menos. Vale salientar que, indivíduos com leishmaniose difusa e leishmaniose visceral ativa não respondem ao teste (Shaw et al., 1975; Silveira et al., 1991; Silveira & Barbosa, 1996; Fundação Nacional de Saúde, 1997; Sassi et al., 1999; Brasil, 2010; Veja-Lopes, 2003; Brito, 2013; Marinho-Júnior, 2015).

5.8.4. Testes sorológicos

São testes que detectam, no soro ou no plasma, anticorpos específicos e são utilizados no diagnóstico de várias doenças. Os testes sorológicos mais utilizados para o diagnóstico das leishmanioses são o RIFI e o ELISA, embora não sejam procedimentos

utilizados na rotina de diagnóstico para LT, pois esta forma apresenta níveis baixos de anticorpos. No Velho e no Novo Mundo tem sido demonstrada a sensibilidade baixa dos mesmos. Alguns estudos têm mostrado que os níveis de anticorpos dependem da forma clínica da doença, do tipo de antígeno utilizado e da espécie de *Leishmania*. Esses testes reagem cruzadamente com a leishmaniose visceral e a doença de Chagas. Na LT os indivíduos que apresentarem mais de uma lesão e os que contraírem a LM terão o título de anticorpos mais altos, e terão melhor resposta aos testes. Em relação à infecção causada pela *L. braziliensis*, nos primeiros anos de LT, a sensibilidade da RIFI é aproximadamente de 70% (Brito et al., 2000). Os pacientes que apresentam lesões ulceradas por *L. guyanensis* apresentam títulos baixos de anticorpos e, conseqüentemente, a sensibilidade é menor (Menzel, Bienzle, 1978; Shaw et al., 1975; Brasil, 2007; Brito, 2013).

Estudos têm demonstrado uma sensibilidade de 88% no ELISA, considerando promissor como teste complementar ao diagnóstico da leishmaniose. Brito et al., 2000, estudaram os antígenos solúveis (30 e 27 kDa) em indivíduos com LT e obtiveram resultados com significado através do teste de *western blotting* cuja sensibilidade era de 91% e a especificidade de 100%. Os testes rápidos que têm sido utilizados, como k39, DPP, entre outros, são testes que auxiliam no diagnóstico, especialmente esse último que foi preconizado pelo Ministério da Saúde para ser utilizado em triagem e trabalhos em campo como com cães (Menezes, 2014; Freire, 2017).

c) Diagnóstico molecular

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Com o avanço da biologia surgiram os testes moleculares, que vêm dando suporte ao diagnóstico da LT, e de outras doenças parasitárias, contribuindo para os diagnósticos clínicos e laboratoriais (Novais, Pires-Alves, Silva, 2004). O PCR é rápido e preciso e apresenta elevadas sensibilidade (94,3%) e especificidade (100%) (Rodrigues, 2000; Rodrigues et al., 2002), tendo ampla capacidade de detectar pequenas partículas de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) do parasito (10 fg do DNA, equivalente a 1/10 do parasita) (Rodrigues, et al., 2002). Devido à sensibilidade

da técnica consegue-se detectar a presença do parasito mesmo que presente em pequenas quantidades e permite realizar a tipagem da *Leishmania* spp. e diagnosticar a doença ainda antes do aparecimento dos primeiros sinais e sintomas (Singh, Sivakumar, 2003; Cavalcanti, 2008).

Apesar da grande eficácia da PCR foram identificadas, no início do século XXI, algumas desvantagens na sua utilização. Nomeadamente, o facto de na realização da eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida utilizar-se o brometo de etídio, substancia considerada tóxica e prejudicial à saúde do operador do experimento. Outras desvantagens são a facilidade de contaminação e a incapacidade de quantificação (Abath, et al., 2002).

qPCR em tempo real

No início da década de 90, do séc. XX, foram realizados estudos para o desenvolvimento das sondas TaqMan, onde se explorou a atividade exonucleásica da taq polimerase (Holland et al., 1991). Higuchi e colaboradores, em 1992, aprofundaram seus estudos sobre a capacidade quantitativa do PCR sem a utilização do brometo de etídio, os quais contribuíram para o surgimento da qPCR. O monitoramento em tempo real do produto a ser amplificado, ocorre com uso de corantes e sondas fluorescentes. O SYBR Green I é um dos corantes mais utilizados que se fixa inespecificamente à nova dupla hélice de DNA durante a amplificação. Em solução livre, o SYBR Green I não produz fluorescência porém ligado à molécula de DNA onde ocasionará intensa luminosidade. A alta toxicidade do brometo vem contribuindo para o uso do corante SYBR Green I no diagnóstico molecular (qPCR). A qPCR é uma metodologia que contribui no diagnóstico das enfermidades com mais eficiência e rapidez, possibilitando a diminuição de contaminação das amostras biológicas e favorecendo uma maior precisão nos resultados analisados. Essa técnica é realizada em tempo real em uma única etapa permitindo à amplificação, detecção e quantificação da molécula de DNA (Holland et al, 1991; Higuchi et al., 1992; Nygen, Svanvik, Kubista, 1998; Mackay, 2002; Bengtsson et al., 2003; Zipper et al., 2004; Mackay, 2004; Saunders, 2004; Oliveira, 2010; Silva, 2017; Lima, 2019).

5. 9. Tratamento

O Antimonial pentavalente (Sb^{+5}) é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da LT. A OMS recomenda que o cálculo da dose de antimonial a ser administrada no paciente com LT seja, em mg, $Sb^{+5}/Kg/dia$. Existem dois tipos de fármaco antimoniais pentavalentes: o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, sendo de referir que esta última não é utilizada para o tratamento da LT no Brasil (Ministério da Saúde, 2004; Rath, 2003; Kato, 2008).

5.9.1. Antimoniato de meglumina

É recomendado para o tratamento de todas as formas clínicas da LT, embora as formas mucocutânea exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. O antimoniato de N-metilglucamina apresenta-se comercialmente em frascos de 5 mL que contem 1,5g do antimoniato bruto, correspondendo a 405mg de Sb^{+5} . Portanto, uma ampola com 5ml corresponde a 405mg de Sb^{+5} e cada ml contem 81mg de Sb^{+5} (Rath, 2003; Ministério da Saúde, 2004; Bezerra, 2004; Kato, 2008; Vasconcelos et al., 2018).

5.9.2. Desoxicolato de Anfotericina B

É um medicamento de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso. Porém, no tratamento de gestantes é considerado como um fármaco de primeira escolha. A anfotericina B, é um antibiótico poliênico de excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular (Bezerra, 2004; Brasil, 2009). O uso da anfotericina B é restrito devido à sua toxicidade, podendo causar calafrios, febre, hipotensão ou hipertensão, alteração dos níveis de potássio e o comprometimento do sistema renal. Outra fórmula com baixa toxicidade foi desenvolvida, em 1990, a anfotericina B lipossômica. Este fármaco de baixo poder de absorção pelos rins órgão mais comprometido pela medicação (Bezerra, 2004; Vasconcelos et al., 2018).

5.10. Medidas preventivas

Algumas medidas de prevenção podem ser adotadas para evitar a transmissão da LT como: uso de repelentes em áreas onde ocorra frequentemente a doença, evitar ficar exposto principalmente ao entardecer e de noite, utilizar na cama um mosquiteiro de malha fina, telar janelas e portas, fazer a limpeza e a manutenção de quintais e terrenos baldios que contribuam para a proliferação da fase jovem (larvas) do vetor, dar um destino adequado ao lixo orgânico de forma a evitar o aparecimento de marsupiais, roedores (silvestres e sinantrópicos) e outros mamíferos que possam ser fonte alimentar dos flebotomíneos, manter sempre limpo os abrigos dos animais, não manter os animais domésticos no intradomicílio durante à noite para evitar a circulação do vetor no interior do ambiente. Entre as residências e a mata sugere-se uma faixa de segurança de 400 a 500 metros (Brasil, 2010).

6. MATERIAL E MÉTODOS

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Características do Município de Moreno

Moreno situa-se na Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco (Figuras 9 e 11). Geograficamente localiza-se a 96 metros de altitude e apresenta clima tropical chuvoso com uma pluviometria média anual de 1.309,9 mm (CPRM, 2005). Moreno é limitado ao Norte pelo Município de São Lourenço da Mata, ao Leste por Jaboatão dos Guararapes, ao Sul por Cabo de Santo Agostinho e ao Oeste por Vitória de Santo Antão (Figura 11).



Figura 9. Vista panorâmica do Município de Moreno-PE.

Fonte: Renata Victor

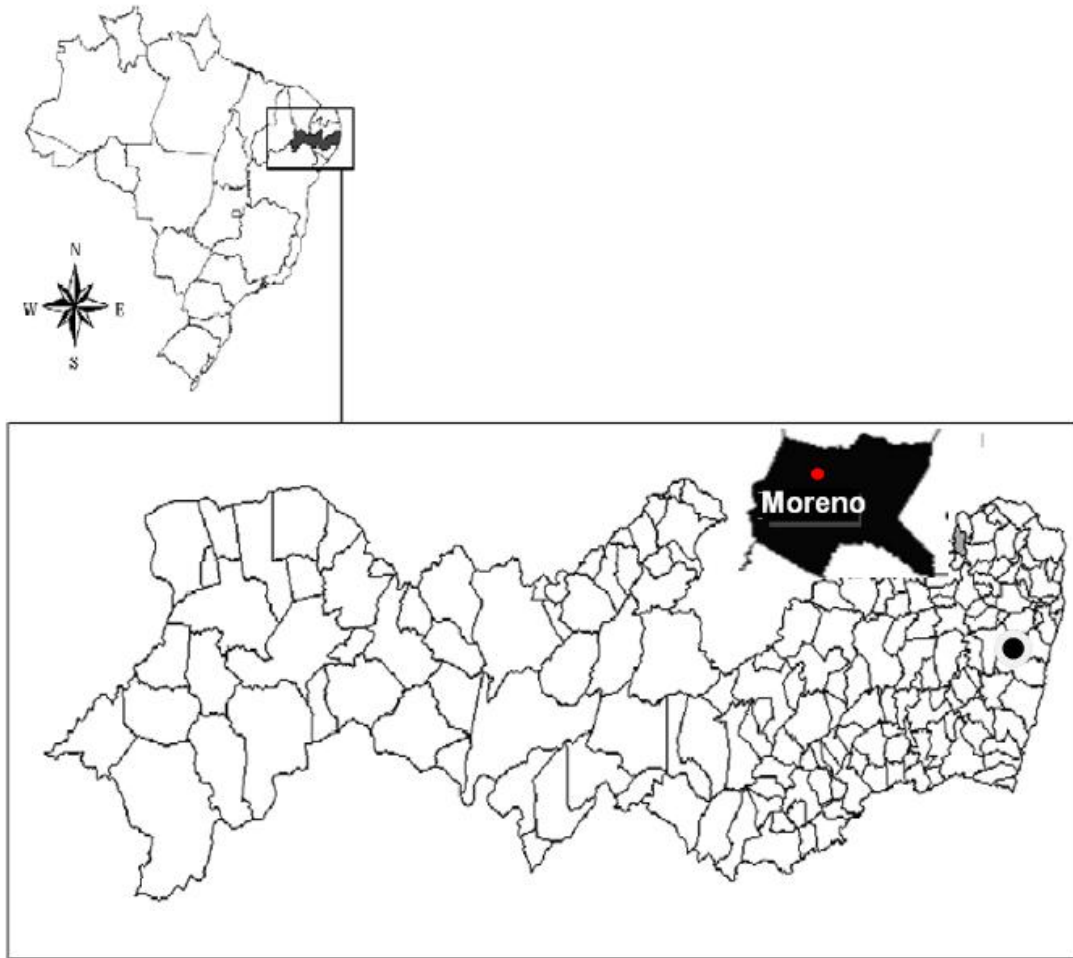


Figura 10. Localização do Município de Moreno no Estado de Pernambuco.

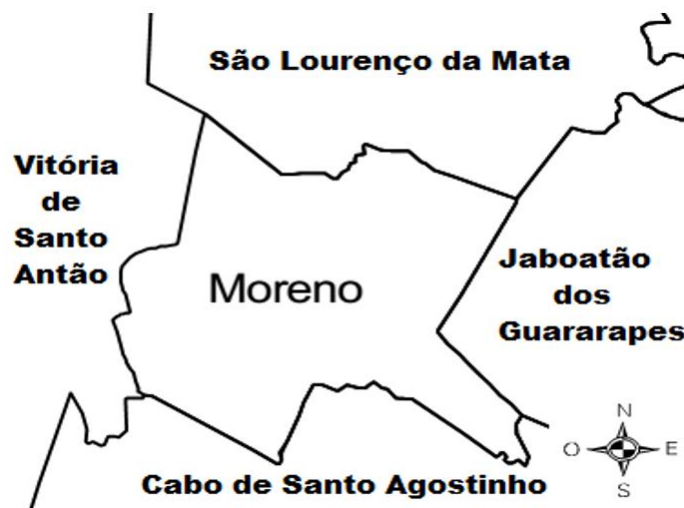


Figura 11. Municípios limites com o Município de Moreno.

Fonte: Morenoredescoberto.blogspot.com-2014

Moreno, com uma área total de 189 km², é constituído por 93,4% de área rural (176,6 km²), onde se encontram 39 engenhos, e 6,6% de área urbanizada. A cobertura vegetal é composta por remanescentes da Mata Atlântica da qual apenas 30% se mantêm preservada, tendo a restante sido urbanizada. O município possui recursos hídricos superficiais constituídos por grande quantidade de nascentes, riachos e rios, importantes para o abastecimento, agropecuária e pesca. Os solos agricultáveis têm um potencial natural coexistindo com microclimas que favorecem a fruticultura. As culturas predominantes são a da cana-de-açúcar e da banana que, ao longo do tempo, têm substituído a vegetação natural de Mata Atlântica (Saldanha, 2003).

Através da Lei Estadual nº 9.989, foram criadas quarenta reservas ecológicas na região metropolitana do Recife, estas constituem áreas de mata de preservação permanente, cuja criação foi uma tentativa de salvaguardar alguns testemunhos remanescentes e Mata Atlântica. O município de Moreno possui cinco dessas reservas ecológicas e uma área de interesse especial (Mata Jardim e Carnijó), conforme a Lei Estadual nº 9.860/86 que delimita as áreas de proteção dos mananciais para a preservação dos recursos hídricos. A área total de reservas, em Moreno, é de 119,89 hectares que corresponde a 6,91% da área do município. Em 1989, um monitoramento das reservas ecológicas demonstrou que após a criação das reservas não foi implantado, efetivamente, um projeto de manejo, fiscalização, controle e regularização fundiária daquelas áreas, o que resultou na degradação ambiental (Saldanha, 2003; Mota, 2004; Freitas, 2016).

A população de Moreno, segundo o CENSO (IBGE, 2010), foi de 56.696 habitantes [50.197 hab. na área urbana (88,54%) e 6.499 hab. na área rural (11, 46%)] (Tabela 1). A distribuição da população por gênero, na zona urbana e na zona rural, para o mesmo ano, está representada na Tabela 2. Estima-se que a população de Moreno, em 2021, seja de 63.792 habitantes de acordo com a base de dados do Governo do Estado de Pernambuco.

Tabela 1. Distribuição da população entre zona urbana e rural. Município do Moreno-PE, 2010.

População		
	n	%
Urbana	50.197	88,54%
Rural	6.469	11,46%
Total	56.696	100%

Tabela 2. Distribuição da população por gênero entre a zona urbana e rural. Município do Moreno-PE, 2010.

População por gênero			
Zona	Homens (n)	Mulheres (n)	Total (n)
Urbana	24.202	25.995	50.197
Rural	3.462	3.037	6.499
Total	27.664	29.032	56.696

6.1.1. Caracterização do Engenho Jardim

O Engenho Jardim localiza-se a 9 km do centro do município do Moreno, é constituído por remanescentes de Mata Atlântica (Mata da Onça) (Figuras 12 e 13) e pela Reserva Carnijó RPPN (Figura 17) que delimita a área de estudo. O Engenho tem uma área de 505 hectares, que anteriormente pertenceram à Indústria Açucareira. Os seus recursos hídricos são córregos, riachos, açudes, cacimbas e nascentes (Apolinário, 2016).



A população do Engenho Jardim é composta por 304 habitantes, 158 do sexo masculino e 146 do sexo feminino. Noventa habitantes (31%) sobrevivem da agricultura com produção de mamão, macaxeira, banana, inhame, maracujá, acerola e de cana-de-açúcar. O cultivo desta última é, ainda, muito comum levando à degradação e substituição da vegetação natural (Figuras 14, 15 e 16) (Silva, 2000 e 2018; Apolinário, 2016).

Figura 12. Fragmento de Mata Atlântica (Mata da Onça), ambiente modificado. Engenho Jardim.
Fonte: autor (2017).



Figura 13. Residência próxima ao fragmento da Mata da Onça.
Fonte: autor, (2017).



Figura 14. Residência próxima ao fragmento de Mata Atlântica (Mata da Onça) e plantação de cana-de-açúcar.
Fonte: autor, (2017).



Figura 15. Fragmento de Mata Atlântica preservada (Reserva Carnijó/RPPN).
Fonte: autor, (2017).



Figura 16. Plantação de banana próxima de residência existente no Engenho Jardim.

Fonte: autor, (2017).



Figura 17. (A) Reserva Carnijó (B) Plantação de cana-de-açúcar no Engenho Jardim

Fonte: autor, (2017).

6.1.2. Caracterização do Engenho Cumaru

O Engenho Cumaru localiza-se a 14 km do centro de Moreno, possui uma área de cerca de 730 hectares e tem uma população de 441 habitantes (227 do sexo masculino e 214 do sexo feminino). A fauna é constituída por pequenos mamíferos, répteis, anfíbios, aves e insetos e na agricultura predomina a monocultura de cana-de-açúcar, de forma extensa (Figuras, 18 A e B).



Figuras 18.A e 20.B - Vista panorâmica do Engenho Cumaru.

Fonte: autor, (2018).

6.2. Descrição do estudo

Para atingir os objetivos propostos foi realizado um estudo transversal no município de Moreno (Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco - PE, Brasil) que abrangeu casos humanos com suspeita de LT, animais domésticos e flebótómíneos.

6.2.1. Participantes

6.2.1.1. Humanos

A amostra de casos humanos autóctones abrangeu os indivíduos residentes em áreas endêmicas da doença que procuraram de forma espontânea o Núcleo de Vigilância em Saúde de Moreno-PE com lesão suspeita de LT, entre 2015 e 2018.

Todos os casos suspeitos foram encaminhados para o Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Pernambuco, onde foram examinados e submetidos à coleta de dados epidemiológicos e de amostras (raspado da lesão, *swab*, fragmento de tecido, punção aspirativa de borda de lesão, fluido salivar e sangue) para serem submetidos a testes laboratoriais. As amostras foram identificadas, acondicionadas e transportadas para o Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Aggeu Magalhães -FIOCRUZ-PE (IAM/FIOCRUZ-PE), onde foram processadas.

Aos casos com diagnóstico confirmado foram solicitados exames complementares (cardiológicos e bioquímicos) e administrada a medicação por via endovenosa. Todos os doentes foram acompanhados ao longo do tratamento até à cicatrização da lesão. Os que não tiveram evolução favorável com o tratamento foram encaminhados para internação e/ou tratamento em hospitais de referências da rede pública do Sistema Único de Saúde em Recife.

6.2.1.2. Animais domésticos

Os animais domésticos estudados fazem parte de uma amostra de conveniência entre os animais domiciliados nos Engenhos Jardim e Cumaru (Moreno) obtida entre junho de 2017 e junho de 2018. Todos foram examinados pelo médico veterinário (Figura 19) e

foi recolhida informação epidemiológica e clínica, sendo a amostra final constituída por caninos, felinos, equinos, caprinos e ovinos, de ambos os sexos e diferentes idades.

Em cada animal houve a coleta de amostra de sangue, secreção da conjuntiva e materiais obtidos das lesões. As amostras biológicas obtidas durante a avaliação clínica foram encaminhadas para o Laboratório de Imunoparasitologia (LIMP) – IAM-FIOCRUZ-PE para serem processadas.

Para todos os animais com diagnóstico confirmado de LT foi feita a sua notificação na Secretaria de Vigilância Epidemiológica para as devidas providências.



Figura 19. Avaliação clínica e coleta de material biológico

Fonte: autor, (2017)

6.2.1.3. Definição de casos

Caso humano de LT foi definido na presença de lesão ativa, dados epidemiológicos (procedente da região endêmica) e teste parasitológico ou molecular positivo. Todos os indivíduos procedentes da região, mas com todos os testes negativos foram considerados sem LT.

Caso de LT em animal doméstico foi definido na presença de lesão ativa ou não (assintomático), histórico epidemiológico (procedente da região endêmica), teste rápido (TR DPP®) positivo (“reagente”) e com um teste laboratorial positivo. Todos os

animais que não apresentassem positividade nos testes de diagnóstico para a doença foram considerados sem LT.

6.2.1.4. Flebotomíneos

Nos Engenheiros Jardim e Cumaru onde surgiram os casos humanos com suspeita de LT foram realizadas capturas de flebotomíneos, entre janeiro de 2017 e dezembro de 2018.

6.3. Métodos

6.3.1. Coleta de amostras nos seres humanos

Em seguida são descritos os procedimentos para a coleta de amostras:

Escarificação – a lesão suspeita foi previamente tratada, antissépticamente, com soro fisiológico estéril (0,9%). Em seguida realizou-se, com auxílio de lâmina de bisturi estéril, o raspado na borda das lesões e foram confeccionados os esfregaços em lâminas (Figura 20).

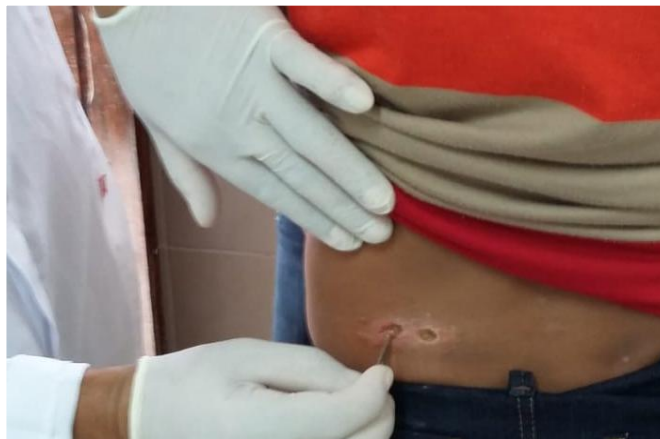


Figura 20. Escarificação das bordas da lesão com lâmina de bisturi para pesquisa direta.

Fonte: autor, (2019).

Punção aspirativa da borda da lesão – após a antissepsia na lesão foi introduzido 0,3mL de soro fisiológico estéril com uma seringa de 5mL e agulha de 25x 8G seguido de

aspiração (Figura 21). O material aspirado foi inoculado em meio de cultivo ou em hamster (*Mesocricetus auratus*) (Brito et al., 2012, Brasil 2007).



Figura 21. Aspirado da borda da lesão.

Fonte: autor (2019).

Biópsias cutâneas – fez-se antisepsia da lesão com clorexidina e infiltração anestésica local com lidocaína (2%), sob condições estéreis e com auxílio de *punch* de 5 mm de diâmetro foram retirados os fragmentos da borda da lesão e colocados em tubo estéril. Esse procedimento foi realizado por profissional médico em ambulatório, e a amostra foi acondicionado a -4°C até análise (Figuras 22 A e B).

Amostras de sangue - alíquotas de sangue foram coletadas por punção intravenosa com seringa de 5mL, agulha 25 x 7G (tubo com EDTA). Essas amostras foram utilizadas para os testes imunológicos e moleculares para o diagnóstico da LT (Figura 23).

Exsudato de lesão - o exsudato cutâneo, presente nas lesões ulceradas, foi coletado com auxílio de *swab* estéril em forma de ‘zig-zag’ por toda extensão delas (centro e borda). Para a realização da coleta em lesões que não apresentaram exsudatos, precedeu-se imersão do *swab* em soro fisiológico estéril (0,9%), realizando-se

posteriormente a coleta. Em lesões crostosas, especialmente aquelas decorrentes de infecções secundárias, foi feita antisepsia na lesão e ela foi humedecida com gazes embebidas em soro fisiológico estéril e, posteriormente, realizou-se a coleta dos exsudatos cutâneos com o *swab* (Figura 24). Os referidos *swabs* foram estocados em tubos de 1,5 ml, posteriormente foram estocados a temperatura de -4°C , até o seu processamento.



Figura 22 (A) Biópsia da borda da lesão.

Fonte: autor, (2019)



Figura 22 (B). *Punch* utilizado na coleta de amostras por biópsia



Figura 23. Coleta de sangue utilizando o sistema a vácuo.

Fonte: autor (2018).



Figura 24. Coleta com uso de *swab* na borda da lesão.

Fonte: autor, (2019).

Fluído salivar - durante o procedimento, a saliva de cada paciente foi dispensada em recipiente e acondicionada à temperatura de -4°C (Figura 25).



Figura 25. Recipiente para dispensar a saliva humana.

Fonte: autor (2018).

6.3.2. Coleta de amostras nos animais domésticos

Amostras de sangue - após antissepsia com álcool etílico 70% foram coletados 2-5 ml de sangue da veia cefálica ou jugular com auxílio de uma seringa de 3 ou 5 ml, acoplada a uma agulha 25x7 mm, em tubo com solução de anticoagulante (EDTA 0,009 g/5 ml de sangue) (Figura 26 A, B, C e D). As amostras de sangue foram estocadas a 4°C até à separação de leucócitos e plasma, após essa etapa, as amostras (de sangue em EDTA e plasmas) foram armazenados a temperatura de -20°C, até ao seu processamento.

Para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), uma alíquota de 2 ml desse sangue foi diluída em igual volume de tampão fosfato-salino (PBS) PH=7,2, em tubo do tipo Falcon de 15 ml. Após a homogeneização desse conteúdo (sangue e PBS), foi adicionado cuidadosamente ao tubo Ficoll Hypaque. Em seguida, os tubos foram submetidos a centrifugação durante 30 minutos a 2000 gx para a separação do plasma e o anel de leucócitos. Em seguida foram retirados o plasma e o anel leucocitário. As amostras foram armazenadas à -70°C (Figura 27).

Swab conjuntival – a secreção ocular foi obtida de animais domésticos através do método de coleta por *swab*, a qual foi realizada na parte interna de toda a pálpebra e acondicionada a temperatura de -4°C (Figura 28 A e B).

Aos animais que apresentaram lesão ativa compatível com LT foi realizada a escarificação para esfregaços em lâmina e punção aspirativa e swab de lesão.



Figura 26. Coleta de sangue em caprino (A e B).

Fonte: autor, (2017)



Figura 26. Coleta de sangue em cão (C) e equino (D).

Fonte: autor, (2017).

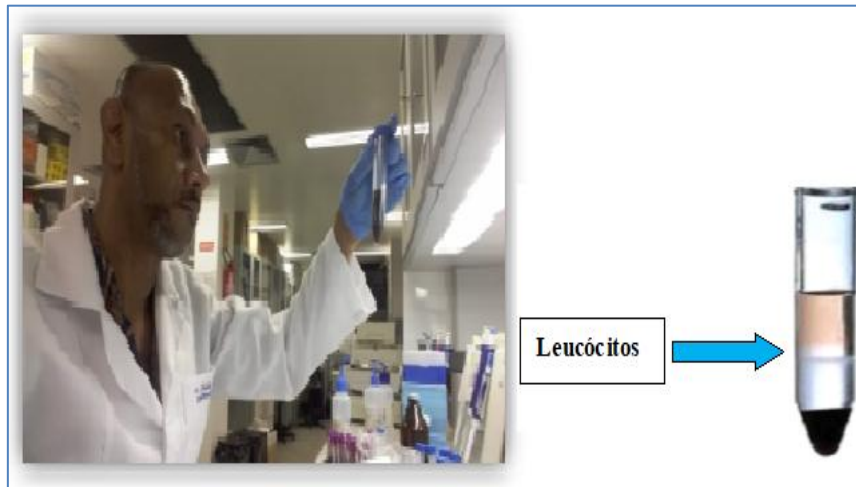


Figura 27. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Fonte: autor, (2017)



Figura 28. (A e B). Coleta da secreção ocular na conjuntiva com o *swab* em equino e cães

Fonte: autor, (2017)

6.3.3. Captura de flebotomíneos

Estas capturas foram realizadas com armadilhas CDC (*Centers for Disease Control miniature light trap*) instaladas no intra e no peridomicílio, em plantações de banana e na área exterior e interior dos resquícios de Mata Atlântica, durante o período

crepuscular e noturno, entre as 17:00 às 6:00 horas do dia seguinte (McNelly, 1989). No interior das residências as armadilhas foram instaladas no local de repouso dos indivíduos (sala e quarto) (Figura 29), no peridomicílio foram colocadas em galinheiros, estábulos, próximos dos bananais (Figuras 30 A, B e C) e em locais com grande quantidade de matéria orgânica (Figuras 31 A, B e C). Houve, ainda, a tentativa de coletas aleatórias na borda e interior de fragmento florestal de remanescente Mata Atlântica (Mata da Serra) (Figuras 32 A e B) e na área do estudo (Figuras 33 A e B).

Todos os pontos de coletas de flebotomíneos foram georreferenciado utilizando-se aparelho GPS de mão (Garminetrex-h-legend) e os pontos foram demarcados um a um como indicados na Figura 34.



Figura 29. Instalação de armadilha tipo CDC no intradomicílio.

Fonte: o autor. (2017).

Os flebotomíneos capturados foram transportados nas armadilhas para Laboratório de Endemias do Núcleo de Vigilância em Saúde de Moreno, onde foram separados por sexo, montados em solução Berleser e feita a identificação morfológica das espécies segundo Young & Duncan, 1994.

Aos exemplares fêmeas foram retirados a cabeça e o terceiro segmento do abdômen e colocados em álcool a 70%. O abdômen foi transportado para o Instituto Aggeu

Magalhães/FIOCRUZ-PE para a detecção de *Leishmania*.spp através do teste molecular, qPCR.



Figura 30. Instalação de armadilha do tipo CDC para captura de flebotomíneos no peridomicílio (A e B) estábulo, (C) galinheiro. Fonte: autor, (201



Figura 31. (A, B e C). Instalação de armadilha do tipo CDC para captura de flebotomíneos em plantações de bananas no Engenho Jardim.

Fonte: autor, (2018).



Figura 32. Remanescente de Mata Atlântica (Mata da Serra) localizada no Engenho Cumaru. **(A)**. Instalação de armadilha do tipo CDC nas bordas da Mata **(B)**.

Fonte:autor, (2018).



Figura 33 (A e B). Instalação da armadilha CDC no interior da Mata.

Fonte: autor, (2017).

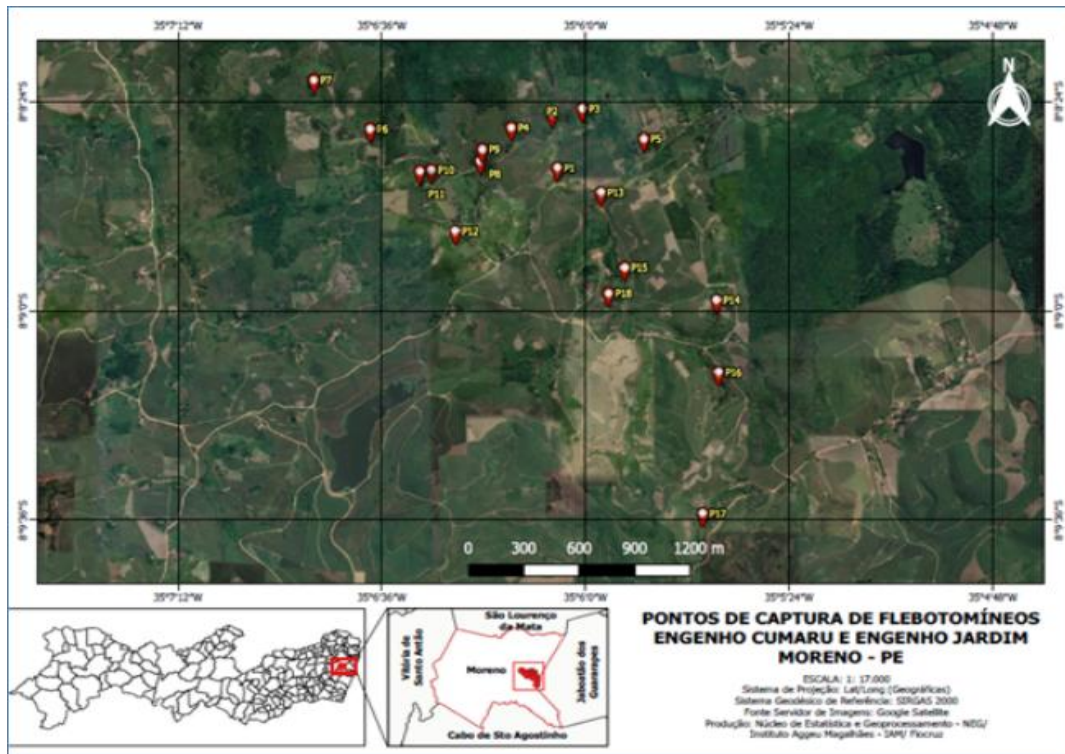


Figura 34. Pontos de captura de flebotomíneos.

Fonte: Servidor de imagens: Google Satellite

6.3.4. Coleta de dados meteorológicos

Entre janeiro de 2017 e dezembro de 2018, período durante o qual se realizou a coleta de flebotomíneos, foi feito o registro dos seguintes dados meteorológicos da região do estudo: temperatura ambiente, humidade relativa e precipitação tendo como base a informação cedida pela Agência Pernambucana de Águas e Clima.

6.3.5. Diagnóstico da Leishmaniose tegumentar

6.3.5.1. Diagnóstico Parasitológico

A. Esfregaço em lâminas (pesquisa direta)

As lâminas de esfregaços com material obtido das lesões foram coradas pela solução de *Giemsa* e observadas em microscópio óptico binocular, objetiva de imersão para visualização da forma amastigota do parasito (Figura 35) (Brasil, 2017).

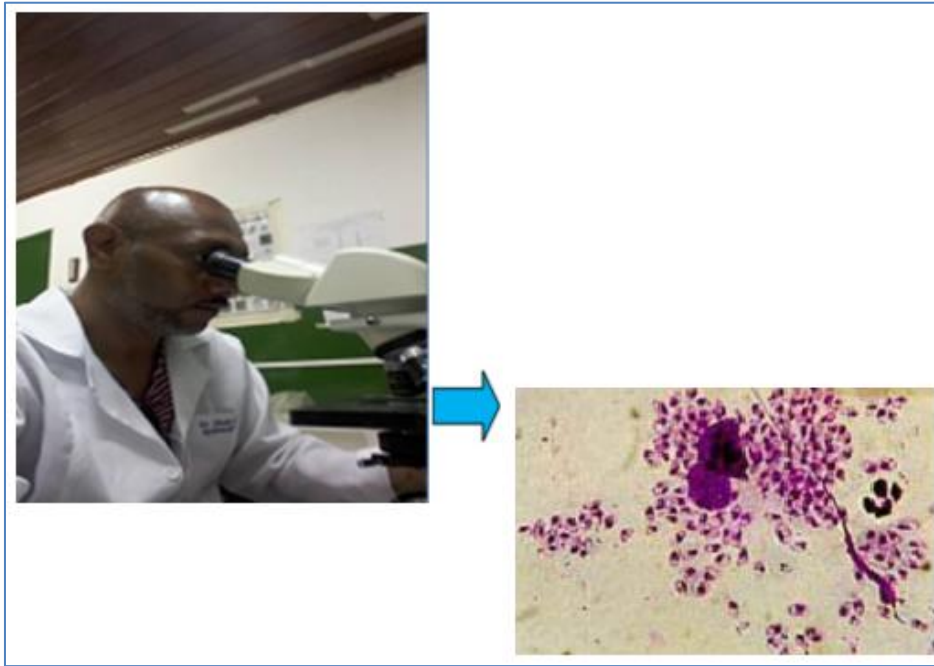


Figura 35. Identificação da forma amastigota de *Leishmania* sp em microscopia óptica visualizada pela objetiva de 100x

Fonte: autor, (2018).

B. Cultura *in vitro*

As amostras biológicas obtidas através de punção aspirativa dos fragmentos de pele e/ou fluido salivar foram adicionadas em meio de cultura NNN modificados (Walton *et al.*, 1977), acondicionadas em estufa *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) a temperatura de 26°C e observadas em intervalos de cinco dias. Os isolados foram enviados à Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (CLIOC) da RIOCRUZ para serem caracterizados e identificados (Boité *et al.*, 2014).

C. Cultura *in vivo*

Uma alíquota de 100µL do macerado de fragmentos de tecido, ou fluido salivar, ou de aspirado de lesão foram inoculadas em hamsters pela via intraperitoneal. Os animais permaneceram no Biotério Experimental do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE) e foram acompanhados durante um período de três meses. Após esse tempo os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina 10% (10-15 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (1-2 mg/kg) e submetidos à eutanásia. Destes animais foram retirados

fragmentos de baço, fígado e pele que foram processados para o possível isolamento e identificação da espécie de *Leishmania* spp. (Brito, 2009).

Obtenção de promastigotas - Os parasitos de *Leishmania braziliensis*, (MHOM/BR/1975/M2903) cepa de referência, foram conservados em meio de cultura Schneider'S (suplementado com 1% de penicilina e estreptomocina) com passagens sucessivas; no 5º dia foram pelletados por centrifugações com duas lavagens em solução Tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2 e diluídos na concentração de 10^6 para serem utilizados como controle das técnicas moleculares.

6.3.5.2. Diagnóstico imunológico

A) Teste Rápido Qualitativo (TR DPP® – Dual Path Platform) – utilizado como teste de triagem imunocromatográfico para detecção em cães de anticorpos específicos para a *Leishmania*. Neste teste utilizou-se o plasma de cães, mas também é possível realizá-lo com soro ou em sangue total venoso. O resultado é obtido em 15 minutos (“reagente” e “não reagente”) e, como é um teste de triagem, permite que apenas os casos positivos (“reagentes”) sejam enviados para confirmação laboratorial. O kit deste teste foi cedido por Bio-Manguinhos, FIOCRUZ-RJ (Figura 36).



Figura 36. Teste Rápido Qualitativo (TR DPP®) para a detecção em cães de anticorpos específicos para a *Leishmania*. Fonte: autor (2018)

6.3.5.3. Diagnóstico molecular

A. Isolamento de leucócitos a partir de sangue total

O sangue periférico coletado dos animais domésticos foi separado em leucócitos e plasma de acordo com o seguinte protocolo de separação por gradiente de concentração:

1. Coletar sangue em tubo com EDTA (anticoagulante); não se pode congelar a amostra;
2. Diluir 4ml de sangue em 4ml de Tampão PBS (pH=7,2) em um tubo “Falcon” de 15ml;
3. Identificar o tubo com o número do doente;
4. Colocar, em outro tubo Falcon (15ml), 3ml de Ficoll Histopaque gelado;
5. Adicionar o sangue, homogeneizado com o PBS, lentamente pela parede do tubo ao tubo com o Ficoll tomando cuidado para não misturar as substâncias;
6. Centrifugar por 30 minutos os tubos em centrífuga a 2000 rpm;
7. Após a centrifugação, retirar o plasma (1ª camada, na parte superior) e o anel leucocitário (nuvem de células brancas);
8. Colocar em tubos com tampa rosqueada distintos, o plasma (dois tubos) e os leucócitos (geralmente em um tubo só);
9. Armazenar em caixa e congelar a -70°C .

Após a separação, as amostras de leucócitos e plasma foram armazenadas e processadas individualmente na qPCR. Para apresentação dos resultados, elas foram analisadas em paralelo e denominadas como “sangue completo”.

B. Extração e purificação do DNA das amostras

Amostras biológicas humanas

A extração e purificação do DNA genômico das amostras de sangue, fluido salivar, exsudato cutâneo, aspirado e tecidos de pacientes humanos foram realizadas através do

kit comercial QIamp® DNA mini kit (QIAGEN, Valência, USA), seguindo o protocolo do fabricante.

Amostras biológicas de animais domésticos

As amostras de leucócitos, plasma, *swab* de conjuntiva ocular e outras, dos animais domésticos tiveram seu DNA extraído através do kit de Sílica (*In house*) padronizado por Silva, 2017. Conforme o protocolo de adsorção da sílica a seguir: adicionando 450µL de NaI à amostra biológica, seguida de homogeneização em vortex durante 15s; foi adicionado 55µL de suspensão de sílica hidratada; onde repetiu-se a homogeneização em vortex durante 15s; o material foi incubado no gelo por 4 min e centrifugado por 30s na velocidade máxima (20.000g ou 14.000 rpm); depois dessa etapa o sobrenadante foi desprezado. Ao pellet foi adicionado 700µL de solução de lavagem e centrifugar por 30s na velocidade máxima em seguida desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem (item 6) 3 vezes. O precipitado foi ressuscitado em 100µL de água MilliQ, depois foi incubado a 45°C por 5min e centrifugado por 30s na velocidade máxima, o sobrenadante foi retirado e armazenado a -20°C.

Exemplares de flebotomíneos

Para os espécimes de flebotomíneos a extração de DNA foi realizada individualmente, seguindo as condições descritas por Solano et al., (1997). A extração do DNA das fêmeas de flebotomíneos utilizadas nos xenodiagnósticos foi realizada individualmente, seguindo as condições descritas por Solano et al. (1997). Inicialmente, foi adicionado a cada tubo contendo um exemplar de fêmea de flebotomíneo, 100uL de solução Chelex 5%, e, em seguida foi realizada a maceração dos flebotomíneos. Após este procedimento, homogeneizou-se o macerado em vórtex por 15 segundos, e, colocou-se o mesmo levou-se ao banho-maria com a temperatura de 56°C por 1 hora. Posteriormente, após o macerado ser homogeneizado em vórtex durante 15 segundos, ele permaneceu no banho-maria elevando-se a temperatura de 94°C, por 30 minutos. Após essa etapa, realizou-se a centrifugação a 13000 rpm por 6 minutos, e, em seguida, o sobrenadante (DNA) foi estocado a -20°C para posterior realização de teste molecular. As amostras purificadas foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific®, modelo 2000c).

C. Curva de Diluição de DNA

Avaliou-se a sensibilidade de detecção de DNA de *Leishmania (Viannia)* sp. Foi utilizado o DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* da cepa de referência (IOC-566-MHOM/BR/75/M2903) diluídas em séries nas concentrações de DNA: 10ng/μL, 1ng/μL, 10pg/μL, 1pg/μL, 100fg/μL, 10fg/μL e 1fg/μL).

D. Amplificação do DNA genômico humano pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação por PCR foi realizada de acordo com as condições descritas por De Bruijn, Barker (1992), tendo como alvo de detecção a região variável do minicírculo do cinetoplasto (kDNA de *Leishmania*) do subgênero *Viannia*. A PCR foi constituída de um mix de 23 μl de uma solução de Tris-HCl 10mM, pH8,3; MgCl₂ 1,5 mM, gelatina 0,01%; 0,2 mM de dNTP; 100pmoles de oligonucleotídeo iniciador (De Bruijn; Barker, 1992) e 0,5 de Taq DNA polimerase (De Bruijn, Barker, 1992; De Bruijn et al, 1993). A essa solução foram adicionados 2 μl de DNA de cada paciente. Um controle negativo (sem DNA) foi utilizado à reação juntamente com o controle positivo (1ng/ μl) de DNA genômico de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, cepa de referência (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903). A PCR foi realizada em 35 ciclo (4°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 1 min) seguido de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados: LEIB1 (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3') E LEIB2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3') amplificaram todo o minicírculo do kDNA de *L. (Viannia)* spp., equivalente a 750 pares de bases (De Bruijn, Barker, 1992). Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão Tris - Acetato 40mM, EDTA 1mM (TAE) corados pelo brometo de etídeo a 10 μg/ml (Sambrook et al., 1989). As bandas de DNA separadas foram visualizadas em um fotodocumentador para gel de eletroforese (L-PIX TOUCH – LOCCUS)

E. Amplificação do DNA genômico de animais domésticos e Humanos por PCR em tempo real (qPCR)

O DNA das amostras foi processado pela qPCR, tendo como alvo o kDNA do subgênero (*Viannia*), amplificando um fragmento de 138 pares de base em termociclador 7500/2011 Applied Biosystems®, através do Software 7500 version 2.0.5 (Applied Biosystems®). A reação teve um volume final de 25µl, contendo 12,5µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems®), 1µL de cada oligonucleotídeo (kDNA 1f 5'-ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC-3' e kDNAr1 5'-GGGAGCGCGGCCCACTATATT'-3) na concentração de 5pmol/µL, 10,5µL de H₂O Milliq e 2µL do DNA da amostra. As reações foram realizadas de acordo com as condições descritas por Paiva-Cavalcanti et al., 2015.

F. Amplificação do DNA genômico de flebotomíneos pela PCR em tempo real (qPCR)

A detecção do DNA das espécies de flebotomíneos ocorreu através do método de PCR em tempo real (qPCR) tendo como alvo a região do minicírculo do kDNA com oligonucleotídeos específico para o subgênero *Viannia* (kDNA 1f 5'-ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC-3' e kDNAr1 5'-GGGAGCGCGGCCCACTATATT'-3), sendo o fragmento de 138pb para amplificação de acordo com Albuquerque (2014).

6.4. Aspectos Éticos

A investigação realizada em seres humanos teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas Humana do IAM-FIOCRUZ-PE, sob o n.º 92/2015 (Anexo 1) e da Comissão de Ética da Universidade Fernando Pessoa, sob o n.º SSD-18072016 (Anexo 2). Foram respeitadas as regras de conduta expressas na Declaração de Helsínquia (World Medical Association, 2013) e a legislação em vigor e garantida a proteção e confidencialidade das informações pessoais recolhidas. Aos participantes foi fornecida informação sobre a natureza do estudo (forma de recrutamento dos participantes e identificação dos objetivos e da equipa de investigação), procedimentos (métodos e

duração da investigação), potenciais riscos e benefícios ou eventual desconforto. Garantiu-se que a participação era voluntária (sem nenhuma sanção ou perda de benefício ou que podia ser interrompida a qualquer momento) e que era assegurada a privacidade e a proteção da confidencialidade da informação. Cada participante teve a oportunidade para colocar as questões que entendeu e foram-lhes fornecidos todos os esclarecimentos. O consentimento informado livre e esclarecido foi assinado pelos participantes e por um investigador no início do estudo.

A pesquisa realizada em animais domésticos obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE, parecer nº155/2017 (Anexo 3). Os seus proprietários ou tutores assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

6.5. Análise Estatística

Na análise estatística foram calculadas frequências, testes de Kappa, de Qui-quadrado de Pearson e de Yates e o teste Exato de Fisher no *software* estatístico SPSS 20.0. A comparação de proporções foi calculada no *MedCalc Software Ltd.* 2021. Foi considerado um $\alpha=5\%$. A associação entre a exposição e a doença foi calculada através da razão de positividade (RP) e respetivos intervalos de confiança (IC) a 95%.

O cálculo em paralelo para analisar as amostras de leucócitos e plasma nos resultados da qPCR foram realizadas de acordo com as definições de Medronho et al. (2002) e apresentadas como “sangue completo”.

7. RESULTADOS

7. RESULTADOS

Casos humanos com suspeita de LT

Foram incluídos nesse estudo 168 casos humanos com suspeita de LT, provenientes de 24 das 38 localidades que constituem o município de Moreno-PE (Gráfico 4), entre 2015 e 2018.

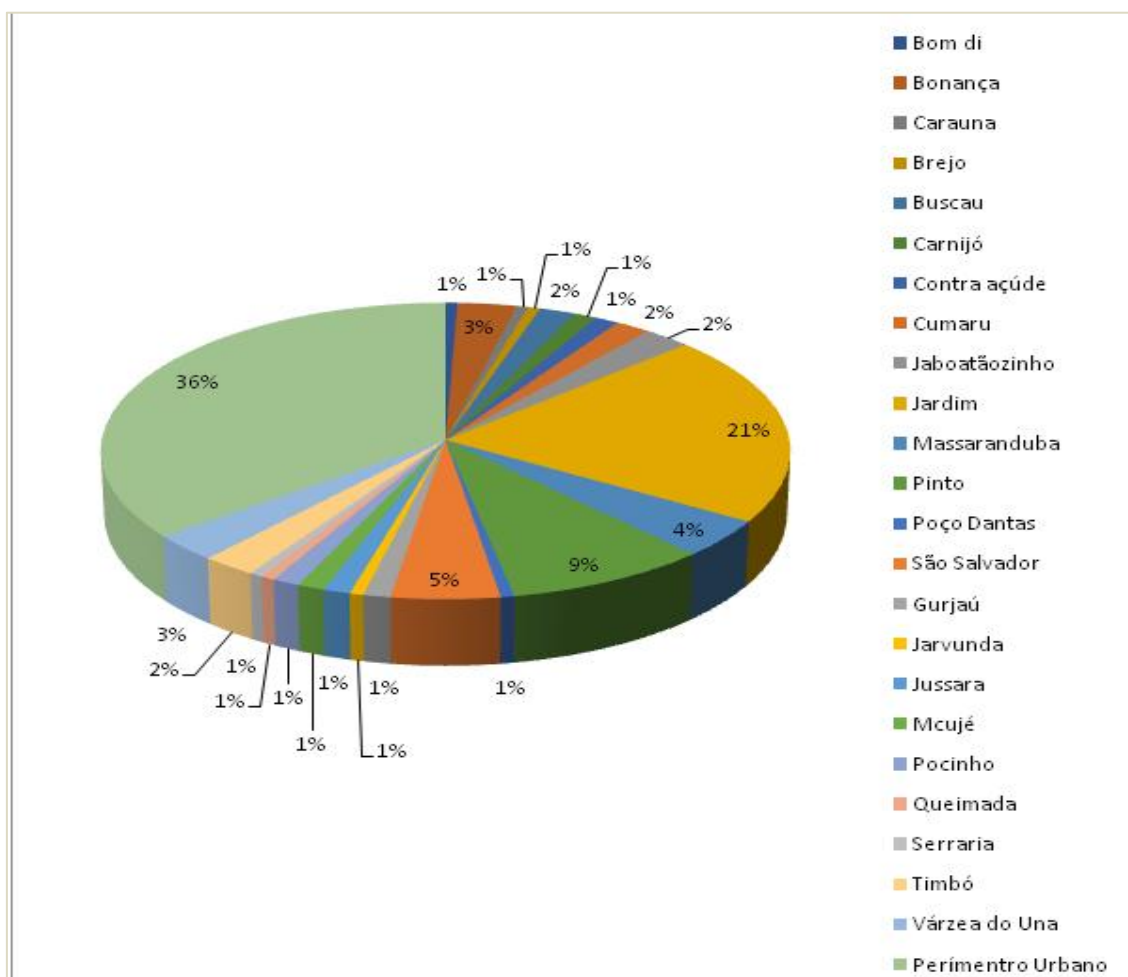


Gráfico 4. Distribuição dos pacientes de acordo com a localidade, do município de Moreno, de onde são provenientes.

Os casos, definidos com base nos critérios já descritos, ocorreram entre os 5 e os 74 anos de idade (média de $37 \pm 18,1$), a maioria era do sexo masculino (63,1%), autodenominados “pardos” e com baixa escolaridade.

Dos casos suspeitos, 112 (66,7%) foram confirmados como casos de LT, 48 (28,6%) não apresentavam a doença e para 8 (4,8%) não se obteve confirmação laboratorial (Tabela 3). Todos os casos apresentavam lesão ativa e eram provenientes de zona endêmica da doença, 65 obtiveram resultado positivo em pelo menos um dos testes parasitológicos e 89 obtiveram resultado positivo em pelo menos um dos testes moleculares.

Tabela 3. Classificação clínica, epidemiológica e laboratorial da amostra de casos confirmados com LT.

Critérios	Resultados					Positivos
						(n)
Lesão ativa	+	+	+	+	+	160
Zona endêmica	+	+	+	+	+	160
Teste parasitológico	+	-	NA	+	+	65
Teste molecular	-	+	+	NA	+	89
Casos de LT	13	14	33	10	42	112

+: positivo; -: não detectado; NA: não avaliado.

As formas clínicas da doença encontradas foram: a cutânea localizada (92,9%), a recidiva cútis (3,6%), a disseminada (2,7%), e uma que evoluiu para cura espontânea (0,8%). A maioria dos doentes apresentava uma única lesão (81,2%) e os restantes mais de dez (múltiplas), com diâmetros entre 0,5x0,5cm a 9,0x7,5cm e períodos de evolução entre 15 dias a 10 meses. Quanto à localização da lesão a maioria (75,9%) ocorreu nos membros inferiores e superiores mas atingiram as diferentes regiões do organismo. Após o diagnóstico de LT, todos os pacientes receberam tratamento com N-glutamine por via intramuscular ou endovenosa e ainda intralesionais.

Dois pacientes apresentaram ainda coinfeção (pioderma gangrenoso e psoríase) ou outras doenças de diagnóstico diferencial: vasculares, úlcera de estases, tuberculose, impetigo, micoses, eczema crônico e foliculite com sinais e sintomas similares à LT.

Quando se comparou a positividade entre os diferentes exames laboratoriais não se encontraram diferenças significativas, nomeadamente na cultura *in vivo* e *in vitro* ($p=0,088$) (Tabela 4). Verificou-se que o teste parasitológico que mais casos confirmados identificou foi a pesquisa direta (25,6%), mas mesmo assim foi inferior aos confirmados pela PCR (55,6%).

Relativamente à distribuição por sexo de acordo com o diagnóstico de LT não se encontraram diferenças quanto ao RP. Apesar do risco de positividade acima dos 18 anos ser ligeiramente superior à classe de referência, não atingiu significado estatístico, o mesmo aconteceu nos autodenominados pardos. Ter o ensino fundamental completo ou incompleto, em comparação com os analfabetos, diminui de forma significativa o risco de positividade para a infecção por *L. (V.) braziliensis* (RP=0,75; [IC 95%: 0,58-0,99]). O ter uma profissão/ocupação parece associar-se com um aumento do risco de positividade mas não atingiu significado estatístico (tabela 5).

Tabela 4. – Resultados dos exames laboratoriais em amostras humanas

Exames laboratoriais (n=168)	Resultado		
	Positivo n (%)	Não detectado n (%)	Não realizado ou contaminado n (%)
Parasitológico			
- Pesquisa direta (esfregaço em lâmina)	43 (25,6)	42 (25,0)	83 (49,4)
- Cultura <i>in vivo</i>	20 (11,9)	23 (13,7)	125 (74,4)
- Cultura <i>in vitro</i>	14 (8,3)	5 (3,0)	149 (88,7)
Molecular			
- PCR convencional	89 (55,6)	52 (32,5)	19 (11,9)

Testes de comparação de exames: Pesquisa direta vs. Cultura *in vivo* $p=0,804$; Pesquisa direta vs. Cultura *in vitro* $p=0,116$; Cultura *in vivo* vs. Cultura *in vitro* $p=0,088$.

Tabela 5. Caracterização da amostra de casos com suspeita de LT de acordo com o diagnóstico e respetivo risco de positividade e intervalo de confiança a 95%

Características	Diagnóstico de LT		Valor de p	RP** [IC: 95%]	Total n (%)
	Positivo n (%)	Não detectado n (%)			
Sexo (n=160)					
Masculino	69 (61,6)	29 (60,4)	0,971	1,02 [0,82-1,25]	98 (61,2)
Feminino	43 (38,4)	19 (39,6)		1,0	62 (38,8)
Faixa etária (n=158)*					
5 a 18 anos	19 (17,0)	10 (21,8)	0,773	1,0	29 (18,4)
19 a 29 anos	24 (21,4)	7 (15,2)		1,18 [0,85-1,64]	31 (19,6)
30 a 49 anos	41 (36,6)	18 (39,1)		1,06 [0,78-1,45]	59 (37,3)
50 a 74 anos	28 (25,0)	11 (23,9)		1,10 [0,79-1,52]	39 (24,7)
Cor da pele (n=160)					
Branca	16 (14,3)	8 (16,7)	0,694	1,0	24 (15,0)
Parda	84 (75,0)	33 (68,8)		1,27 [0,50-3,26]	117 (73,1)
Negra	12 (10,7)	7 (14,6)		0,86 [0,24-3,02]	19 (11,9)
Nível de escolaridade (n=160)					
Analfabeto	27 (24,1)	8 (16,7)	0,021	1,0	35 (21,9)
Ensino fundamental incompleto ou completo	39 (34,8)	28 (58,3)		0,75 [0,58-0,99]	67 (41,9)
Ensino médio incompleto ou completo	46 (41,1)	12 (25,0)		1,03 [0,82-1,29]	58 (36,2)
Ocupação (n=160)					
Profissões agrícolas	34 (30,3)	18 (37,5)	0,293	1,08 [0,43-2,68]	52 (32,5)
Outras profissões (ambiente interior ou misto)	57 (50,9)	18 (37,5)		1,81 [0,75-4,39]	75 (46,9)
Sem profissão (crianças e estudantes)	21 (18,8)	12 (25,0)		1,0	33 (20,6)

* não havia informação para 2 indivíduos; ** RP – risco de positividade calculado como razão de prevalência.

A tabela 6 apresenta os resultados da PCR em função do tipo de amostra. Verificou-se que o teste molecular – PCR – realizado com base na *swab* da lesão foi o que mais casos identificou (59,2%), seguido do da biópsia (55,8%) e do do fluído salivar

(54,7%). Encontrando-se diferenças estatisticamente significativas na comparação da *swab* da lesão com a do sangue ($p=0,049$).

Foi realizado o teste de Kappa para medir a concordância do teste de PCR entre amostras coletadas por fragmento de tecido (biópsia) e *swab* da lesão. O valor do Kappa foi de 60,8% e $p < 0,001$.

Tabela 6. Tipos de amostras biológicas em casos humanos com suspeita de LT e resultados da PCR.

Amostras biológicas	PCR convencional	
	Positivo n (%)	Não Detectado n (%)
Biópsia (fragmento do tecido)	29 (55,8)	23 (44,2)
<i>Swab</i> da lesão	58 (59,2)	40 (40,8)
Sangue periférico	17 (39,5)	26 (60,5)
Fluído salivar	29 (54,7)	24 (45,3)
Punção da lesão	25 (43,9)	32 (56,1)

Testes de comparação de amostras: Biópsia vs. *Swab* $p=0,819$; Biópsia vs. Sangue $p=0,171$; Biópsia vs. Saliva $p=0,930$; Biópsia vs. Punção $p=0,294$; *Swab* vs. Sangue **$p=0,049$** ; *Swab* vs. Saliva $p=0,721$; *Swab* vs. Punção $p=0,343$; Sangue vs. Saliva $p=0,202$; Sangue vs. Punção $p=0,819$; Saliva vs. Punção $p=0,343$.

Animais domésticos

Foram avaliados 272 animais domésticos domiciliados nos Engenhos Jardim (62,9%) e Cumaru (37,1%) em Moreno, entre junho de 2017 e junho de 2018. Quanto à sua espécie 212 eram *Canis familiaris* (cães), 33 *Equus a. asinus* (burros) ou *Equus f. caballus* (cavalos), 21 *Felis catus* (gatos), 5 *Capra a. hircus* (cabras) e 1 *Ovis aries* (ovelha). Todos esses animais eram de raças e idades variadas, de ambos os sexos.

Do total de animais estudados 168 eram machos e 104 fêmeas. A distribuição por sexo de acordo com a espécie é apresentada na tabela 7. A média de idades, no geral, era de $4 \pm 3,0$ anos e a grande maioria apresentava porte médio ou grande (Tabela 8).

Tabela 7. Distribuição dos animais domésticos por sexo de acordo com a espécie.

Espécie	Machos n (%)	Fêmeas n (%)	Total n (%)
<i>Canis familiaris</i>	131 (61,8)	81 (38,2)	212 (78,0)
<i>Equus ballus /Equus asinus</i>	23 (69,7)	10 (30,3)	33 (12,1)
<i>Felis catus</i>	12 (57,1)	9 (42,9)	21 (7,7)
<i>Capra aegagrus hircus</i>	1 (20,0)	4 (80,0)	5 (1,8)
<i>Ovis aries</i>	1 (100)	0 (0,0)	1 (0,4)
Total	168 (61,8)	104 (38,2)	272 (100)

Tabela 8. Distribuição dos animais domésticos por porte de acordo com a espécie.

Porte	Pequeno n (%)	Médio n (%)	Grande n (%)
<i>Canis familiaris</i>	57 (26,9)	149 (70,3)	6 (2,8)
<i>Equus ballus /Equus asinus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	33 (100)
<i>Felis catus</i>	20 (95,2)	1 (4,8)	0 (0,0)
<i>Capra aegagrus hircus</i>	0 (0,0)	5 (100)	0 (0,0)
<i>Ovis aries</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100)

A maioria dos animais domésticos apresentavam pelo de cor clara (54,4%) e na quase totalidade de comprimento curto (93,4%). Relativamente à composição corporal, de acordo com os parâmetros utilizados na veterinária, 3,7% eram caquéticos e 12,5% magros (Tabela 9).

Em termos clínicos 13,2% dos animais domésticos apresentavam lesão cutânea e 0,7% tinham linfadenopatia. Quarenta e dois virgula três por cento apresentavam ectoparasitas, 8,1% tinha dermatite, 2,2% seborreia, 9,6% alopecia e 2,2% onicogribose (Tabela 10).

Tabela 9. Características físicas gerais dos animais domésticos.

Características	Frequência n (%)
Cor do pelo do animal	
Claro	148 (54,4)
Escuro	110 (40,4)
Não avaliado	14 (5,2)
Comprimento do pelo do animal	
Curto	254 (93,4)
Longo	14 (5,1)
Não avaliado	4 (1,5)
Condição corporal do animal	
Caquético	10 (3,7)
Magro	34 (12,5)
Normal	221 (81,2)
Sobrepeso	3 (1,1)
Não avaliado	4 (1,5)

Tabela 10. Características clínicas I dos animais domésticos.

Características	Frequência n (%)
Presença de lesão cutânea	
Sim	36 (13,2)
Não	235 (86,4)
Não avaliado	1 (0,4)
Presença de linfadenopatia	
Sim	2 (0,7)
Não	266 (97,8)
Não avaliado	4 (1,5)
Presença de ectoparasitas	
Nenhum	157 (57,7)
Pulga	53 (19,5)
Carrapato	45 (16,5)
Ambos	17 (6,3)
Presença de dermatite	
Sim	22 (8,1)
Não	249 (91,5)
Não avaliado	1 (0,4)
Presença de seborreia	
Sim	6 (2,2)
Não	263 (96,7)
Não avaliado	3 (1,1)
Presença de alopecia	
Sim	26 (9,6)
Não	245 (90,0)
Não avaliado	1 (0,4)
Presença de onicogribose	
Sim	6 (2,2)
Não	265 (97,4)
Não avaliado	1 (0,4)

Relativamente a aspetos clínicos oftalmológicos verificou-se que 2,2% dos animais domésticos apresentavam palidez da mucosa ocular, nenhum tinha conjuntivite, 4,8% apresentavam secreção ocular e 0,4% queratite. (Tabela 11).

Tabela 11. Características clínicas II dos animais domésticos.

Características	Frequência n (%)
Cor da mucosa ocular	
Normal/rósea	256 (94,1)
Pálida	6 (2,2)
Não avaliado	10 (3,7)
Presença de conjuntivite	
Não	271 (99,6)
Não avaliado	1 (0,4)
Secreção ocular	
Presente	13 (4,8)
Ausente	258 (94,9)
Não avaliado	1 (0,4)
Presença de queratite	
Sim	1 (0,4)
Não	270 (99,2)
Não avaliado	1 (0,4)

Foi calculado o risco de os animais terem infecção por LT e as variáveis associadas através da razão de prevalência, demonstrados na tabela 12. As variáveis que não estão na tabela não tiveram associação com risco de ter LT.

Tabela 12. Razão de prevalência relativa ao risco do animal ter infecção por *L. (V.) braziliensis*, medida pelo resultado da qPCR.

	Valor de p	RP	Intervalo de confiança de 95%
Condição corporal (desnutrido)	0,014	1,95	1,14-3,32
Comprimento do pelo (curto)	<0,001	2,36	1,96-2,83
Cor do pelo (claro)	<0,001	2,26	1,85-2,77
Com alopecia	<0,001	2,62	2,43-2,82
Com dermatite	<0,001	2,42	2,20-2,80
Com seborreia	<0,001	2,72	2,12-2,92
Membrana ocular pálida	<0,001	2,72	2,12-2,92
Com queratite	<0,001	2,16	1,96-2,37
Com onicogribose	<0,001	2,13	1,84-2,47
Com secreção ocular	<0,001	2,18	1,98-2,40
Com linfadenopatia	0,014	1,95	1,14-3,32

Entre os 272 animais domésticos foram coletadas 255 amostras de sangue e 192 *swabs* da conjuntiva que foram submetidas ao teste molecular. A positividade do esfregaço da lesão cutânea em qPCR de animais domésticos é descrita na tabela 13. Verificou-se que 174 animais (64%) eram positivos para a *Leishmania spp.*

Dos 174 animais domésticos positivos para a *Leishmania spp.*, 52,6% eram assintomáticos. Dos 36 animais com lesão cutânea suspeita (Figura 37) 3 cães apresentavam lesão no focinho com destruição da cartilagem e mucosa. Após a realização do teste parasitológico (pesquisa direta) e qPCR verificou-se que 31 eram positivos para a LT (1 gato, 1 ovelha e 29 cães) e 5 animais apresentavam diagnóstico diferencial para esporotricose.

Tabela 13. Resultados de qPCR para detecção de *Leishmania* spp em amostra de sangue, de swab da conjuntiva ou swab da lesão de animais domésticos.

Animal doméstico	Amostra biológica	Resultado Positivo n (%)	Não detetado n (%)	Não colhido n (%)	Total n (valor p)*
Cão	Sangue	141 (66,5)	63 (29,7)	8 (3,8)	212
	Swab	38 (17,9)	115 (54,3)	59 (27,8)	(<0,001)
Cavalo	Sangue	19 (57,6)	14 (42,4)	0 (0,0)	33
	Swab	5 (15,1)	16 (48,5)	12 (36,4)	(0,031)
Gato	Sangue	11 (52,4)	1 (4,8)	9 (42,8)	21
	Swab	5 (23,8)	8 (38,1)	8 (38,1)	(0,011)
Cabra	Sangue	2 (40,0)	3 (60,0)	0 (0,0)	5
	Swab	1 (20,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	(---)
Ovelha	Sangue	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1
	Swab	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	(---)
Total	Sangue	174 (64,0)	81 (29,8)	17 (6,2)	272
	Swab	49 (18,0)	143 (52,6)	80 (29,4)	(<0,001)

* Comparação realizada entre “resultado positivo” e “não detectado”.



Figura 37. (A) Cão com LTA mucocutânea com destruição do focinho; (B) Gato e (C) Ovelha com lesão de LTA na orelha. Fonte: Autor (2017).

Na análise paralela entre os resultados da qPCR e da existência, ou não, de lesão cutânea verificou-se uma concordância de 87,3% dos resultados negativos e de 12,6% dos resultados positivos (Tabela 14).

A comparação de positividade entre as diferentes amostras biológicas coletadas nos animais domésticos, por análise paralela, mostra uma maior positividade por *swab* da lesão cutânea (85,7%) e por análise de sangue completo (73,3%) (Tabela 15).

Analisando a quantidade de DNA médio encontrado nos animais domésticos, verificou-se que foi a amostra de plasma a que apresentou média absoluta mais elevada (2.412,50₋+5.878,49 fg de DNA), variando a concentração encontrada entre 0 e 27.888,44fg de DNA. Nos leucócitos, a média absoluta foi de 1.428,33₋+6.960,04fg de DNA, variando de 0 a 76.101,92fg. Já na *swab* da conjuntiva ocular, observaram-se os números absolutos mais baixos, sendo a quantidade média detectada pela qPCR de 2,13₋+9,85fg de DNA, variando de 0 a 127fg.

Tabela 14. Resultado do qPCR em função da existência, ou não, de lesão cutânea compatível com LT.

	Lesão cutânea		
	Sim	Não	Total
qPCR (análise paralela)*	n (%)	n (%)	n (%)
Positivo	24 (12,6)	167 (87,4)	191 (100)
Negativo	9 (12,7)	62 (87,3)	70 (100)
Total	33 (12,6)	229 (87,4)	262** (100)

* Análise paralela - todo o tipo de amostra biológica foi analisado em paralelo: quando todos os resultados qPCR foram negativos, o resultado global "qPCR" foi negativo; quando pelo menos um resultado qPCR, em qualquer amostra biológica foi positivo, o resultado global "qPCR" foi positivo; ** em 10 animais não foi possível obter resultados de qPCR.

Tabela 15. Comparação de positividade entre diferentes amostras biológicas de animais domésticos.

Tipo de amostra biológica	valor de p	Positividade no qPCR
		Sangue completo* (leucócitos+plasma)
Sangue completo vs. swab da conjuntiva	<0,001	Swab da conjuntiva 25,8%
Sangue completo vs. swab da lesão cutânea	0,464	Swab da lesão cutânea 85,7%

* Análise paralela - todo o tipo de amostra biológica foi analisado em paralelo: quando todos os resultados qPCR foram negativos, o resultado global "qPCR" foi negativo; quando pelo menos um resultado qPCR, em qualquer amostra biológica foi positivo, o resultado global "qPCR" foi positivo.

Flebotomíneos

Nos Engenhos Jardim e Cumaru onde surgiram os casos humanos com suspeita de LT foram capturados 239 espécimes de flebotomos, entre janeiro de 2017 e dezembro de 2018, que posteriormente foram identificados de acordo com a metodologia indicada. Todos os exemplares eram *Lutzomyia whitmani*, com a exceção de uma fêmea que era *Lutzomyia evandroi* (Tabela 16).

Tabela 16. Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados com armadilha CDC nos Engenhos Jardim e Cumaru no município do Moreno-PE, no período de 2017 a 2018.

Espécie	Machos	Fêmeas	Total
	n	n	n
<i>Lutzomyia whitmani</i>	80	158	238
<i>Lutzomyia evandroi</i>	0	1	1

Durante o período de estudo verificou-se que a presença do vetor ocorreu particularmente em dois momentos: em agosto de 2017 e em julho de 2018 (Gráficos 5 e 6). No primeiro momento, quando foram capturados 13 exemplares (12 machos e 1 fêmea), a temperatura ambiente variou entre 20 e 28°C, a umidade relativa entre 51 e

70,4% e a pluviometria foi de 123,2mm (com média anual: 1.619,8mm). No segundo momento, quando foram capturados 226 exemplares (68 machos e 158 fêmeas), a temperatura ambiente variou entre 22 e 26°C, a umidade relativa entre 57 e 79% e a pluviometria foi de 4,0mm (com média anual: 1.331,4mm).

No peridomicílio a infestação de flebotomíneos era mais comum em galinheiros (92%) do que nos estábulos mas, no geral, os abrigos dos animais domésticos eram próximos das residências e tinham higiene precária.

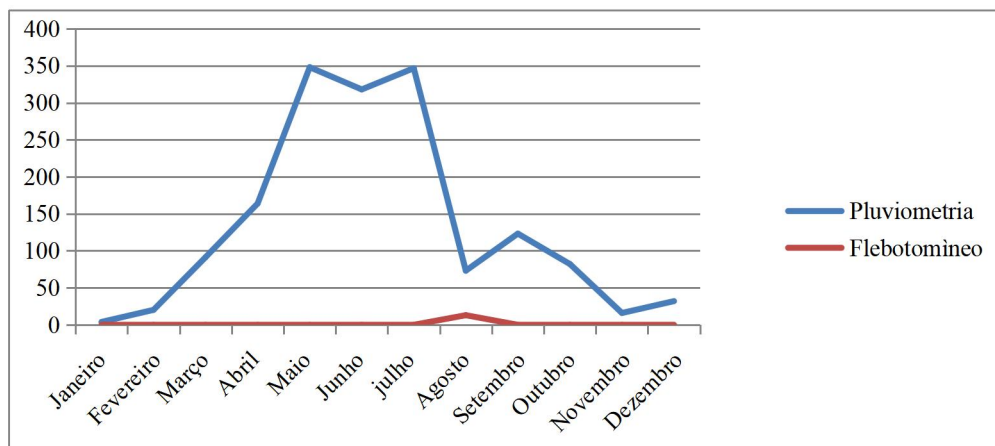


Gráfico 5. Variação de flebotomíneos capturados e da pluviometria no ano de 2017, em Moreno.

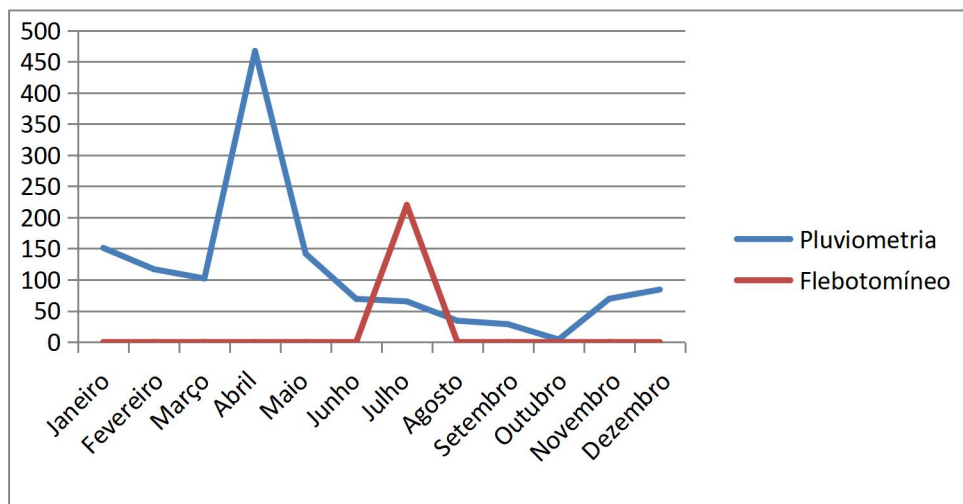


Gráfico 6. Variação de flebotomíneos capturados e da pluviometria no ano de 2018, em Moreno.

Os flebótomos fêmeas capturados foram submetidos à qPCR para verificação de infecção pela *L. (V.) braziliensis*. Entre os classificados como alimentados (com sangue no abdômen, n=27) foram positivos 59,3% (n=16) e entre as fêmeas não alimentadas (sem sangue visível no abdomen, n=132) 33,3% (n=44) foram positivas, o que significa que tinham estado alimentadas há mais tempo e a qPCR teve capacidade de detecção. A média de DNA de *L. (V.) braziliensis* entre as fêmeas não alimentadas foi de $2,79 \pm 11,63$ fg (variando de 0 a 119,669fg) e nas fêmeas alimentadas foi de $10,07 \pm 28,28$ fg (variando de 0 a 146,109fg). Na totalidade das fêmeas a taxa de infecção foi de 37,7%.

8. DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o ciclo de transmissão da LT em áreas de colonização antiga de PE através dos dados clínicos-epidemiológicos da população humana, de flebotômicos vetores, de espécies de *Leishmanias* e de animais domésticos. Segundo os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Ministério da Saúde, 2021), o Estado possui uma média de 381 casos de LT ao ano. Em 2015, o município de Moreno, que apresenta em média 50 casos anuais, duplicou esse número para 100 novos casos (dados não publicados).

Neste estudo, os participantes humanos eram majoritariamente do sexo masculino, em idade economicamente ativa e autodenominados “pardos”, padrão das populações vulneráveis à infecção por *Leishmania* spp (Pezente & Benedetti, 2019). A doença abrange diferentes idades, inclusive crianças (Brandão-Filho et al., 2003; Silva, 2001; Nasser et al., 2017; Rocha et al., 2015; Melo et al., 2020; Araújo et al., 2020). Um estudo anterior na mesma população, encontrou uma positividade de 22,4% com teste de Montenegro (Silva, 2001). Vinte anos depois, este estudo encontrou uma positividade de 66,7% para infecção com LT.

A escolaridade foi considerada como um fator significativamente protetor para LT em indivíduos com ensino fundamental completo ou incompleto em comparação com os analfabetos. Outros estudos verificaram que a infecção por *Leishmania* spp. é predominante em indivíduos com baixa escolaridade (Araújo et al., 2020), de cor parda e tendo como ocupação a agricultura (Maia et al., 2017), tal como no presente estudo.

Uma possível explicação é que a maioria dos agricultores do Brasil possui baixa escolaridade e, pelas condições de trabalho, estão expostos ao vetor infectado sem qualquer proteção ou cuidado (Erazo et al., 2020; Silva Junior et al., 2020). Além da limitação ao acesso à informação, uma vez que, na maioria das vezes tem pouco acesso aos serviços de saúde (Melo et al., 2020).

Relativamente à doença, identificaram-se diversas formas clínicas da LT, predominando a forma ulcerada, com exceção da forma difusa, o que é corroborado por outros estudos (Brito et al., 2012; Costa, 2009; Vasconcelos et al. 2018). No Brasil, 90% dos casos notificados apresentam a forma cutânea, a mucocutânea varia de 3 a 6%

dos casos dependendo da região (Lima, 2017; Vasconcelos, et al., 2018). As manifestações clínicas desta doença são variáveis e dependentes das espécies de *Leishmania* e da resposta imunológica do hospedeiro (World Health Organization, 2010; Burza et al., 2018; Melo et al., 2020). Os tipos, números e diâmetros das lesões apresentados pelos pacientes em pauta foram avaliados, bem como o período de evolução da doença. Os pacientes apresentavam desde lesão única a um número maior do que 10 lesões. Nesse estudo o quantitativo de lesões apresentados foram na sua maioria de lesão única. Achados confirmados por Melo et al. (2020), que encontraram em 27,7% dos pacientes de PE, quando compararam aos pacientes do Amazonas em seus estudos, lesão única neles. Outro fato importante foram os aspectos clínicos da forma das lesões, que embora citados na literatura, são menos frequentes, a exemplo: forma em placa, crostosa, nodular, eritematosa, verrucosa e mucocutânea. Sabe-se que a apresentação clínica exhibe polimorfismo e espectro de gravidade dos sinais e sintomas também variáveis, que embora exista certa correspondência entre ambas, as formas clínicas e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvida na transmissão da LT (Brasil, 2017; Melo et al., 2020).

Os pacientes das localidades em questão apresentaram coinfeção (pioderma gangrenoso e psoríases) ou outras doenças de diagnóstico diferencial (vascular, úlcera de estases, impetigo, eczema crônica e foliculite) com sinais e sintomas similares à LT. Esse padrão dificulta o diagnóstico da LT (Brasil, 2017), daí a necessidade de testes diagnósticos específicos e sensíveis para LT (Thakur et al., 2020).

Os resultados da pesquisa direta (esfregaços) identificaram mais casos positivos de LT do que os isolados obtidos em cultura, embora sua sensibilidade seja de aproximadamente 50% para *L. braziliensis* (Montenegro, 1926). Para um inquérito populacional de larga escala, o recurso a isolados em cultura têm-se revelado inadequados por exigirem uma infra-estrutura laboratorial específica e técnicos treinados. Os isolados obtidos de hamsters (*Mesocricetus auratus*) – cultura *in vivo* - tiveram positividade maior do que os isolados da cultura *in vitro*, embora sem significado estatístico, o que pode ser explicado pelo baixo número de exames realizados. Sabe-se ainda que, a eficiência desse método apresenta variação de acordo com o agente etiológico (Inocência da Luz, et al., 2009).

A espécie de *Leishmania* circulante na região foi identificada em estudos anteriores como *L. (V.) braziliensis* (Brito et al., 2009; 2012; 2018; Boité et al., 2012; Cupollilo et al., 1994) e comprovada com os testes de qPCR realizados, específicos para a espécie. A *L. (V.) braziliensis* é encontrada em todo o país, contribuindo para o aumento da doença (Brasil, 2017) e em PE está presente em diversas localidades do estado (Brito et al., 2009; 2012; 2018; Brandão-Filho et al., 2003).

Os testes moleculares são utilizados em diversos tipos de amostras biológicas para confirmação de infecção por *Leishmania spp.*, apresentam alta sensibilidade e especificidade, além de serem rápidos e eficazes (De Bruijn et al., 1992; Moraes et al., 2013a; Rodrigues, et al., 2002). A PCR tem sensibilidade de detecção até 1 fentograma (10^{-15} g) de moléculas de DNA de *Leishmania*, o que corresponde a 1/10 do parasita (De Bruijn et al., 1992). Esse método foi padronizado em amostras de tecidos (métodos invasivos) para identificação de espécies de *Leishmania* em casos subclínicos da doença ou de baixa carga parasitária, acompanhamento do tratamento e distinção entre infecções ativas e passadas (Rodrigues, et al., 2002).

A PCR tem poder estatístico para definir o diagnóstico da LT em pacientes humanos nos diversos tipos de amostras biológicas analisadas. Portanto, a combinação entre procedimentos de coleta de amostras pouco ou nada invasivas, como o *swab* da lesão, o fluido salivar e sangue, e o teste PCR para definição diagnóstica da LT é muito importante (Corvalan et al., 2011; Melo et al., 2020). Sobretudo em relação aos testes parasitológicos, com positividade mais baixa (Moreira et al., 2007; Shahbazi et al., 2008) e necessidade de coletas invasivas (punção da lesão e biópsia). A concordância na PCR entre as amostras de fragmento de tecido e *swab* da lesão tiveram índice de concordância muito significativo, conforme índice de Kappa de Cohen (Landis & Koch 1977), o que demonstra a eficácia da técnica de coleta por *swab* em relação à biópsia (Landis & Koch 1977). A divergência dos resultados pode ser atribuída à baixa quantidade de parasitos (na lesão ou no exsudato), uma vez que os parasitas não se encontram dispostos de forma uniforme na lesão, podendo levar a um falso-negativo (Shahbazi et al., 2008).

A amplificação do DNA de *L. (V.) braziliensis* por PCR, realizada a partir de amostras de sangue de pacientes, revelou-se baixa em comparação às amostras de biópsia de

tecido, devido à escassez de parasitos circulantes nessa amostra biológica (Martins, Alexandrino, Guimarães, 2010). A presença dos parasitos envolvidos na leishmaniose visceral tem sido detectada em amostras de tecidos, sangue, urina, fezes e a partir de amostras coletadas por *swab* de secreções orais e nasais (Strauss-Ayali et al., 2004), o mesmo poderá acontecer com a *L. (V.) braziliensis*.

Os animais domésticos que participaram do estudo apresentaram alto índice de positividade para a LT através da qPCR, sobretudo nas amostras de sangue. O que demonstra alta prevalência da infecção na região, mesmo com alguns animais assintomáticos. Pode-se observar que o cão é a espécie de animal doméstico com maior percentual de positividade no sangue. Provavelmente o tipo de comportamento desses animais que transitam por mais regiões e diversas áreas do peridomicílio contribua para uma maior chance de serem picados pelas fêmeas de flebotomíneos. É importante ressaltar que mais de 70% deles tinham o porte classificado como médio a grande. Assim como os equídeos, de grande porte, que também são parasitados por *Leishmania* spp. Diversos estudos já confirmaram a presença da *L. (V.) braziliensis* nesses animais domésticos que residem em áreas endêmicas (Vedovello-Filho et al., 2008; Soares et al., 2013; Benassi et al., 2018; Vieira et al., 2020; Brandão-Filho, 2003).

Cinco animais que apresentaram lesões semelhantes às dos animais acometidos por LT foram positivos na qPCR exclusivamente para esporotricose, dermatose comum em cães e gatos. Essa doença causada por um fungo faz parte das doenças diferenciais, por essa razão necessita-se de métodos de diagnóstico efetivos para uma abordagem terapêutica (Gontijo, 2011). Um outro caso de relevância no nosso estudo, foi o de uma ovelha que apresentava lesão similar à LT, que é um quadro sintomático pouco comum, e que por pesquisa direta se confirmou ser positiva para a LT. Um caso semelhante ocorreu na África do Sul, onde uma ovelha apresentou uma lesão que evoluiu para cura espontânea (Van-Der-Lugt et al., 1992). De acordo com Dantas-Torres (2006), o diagnóstico de animais domésticos assintomáticos é de considerável importância, pois podem constituir reservatórios de *Leishmania* spp.

A maioria dos animais doméstico em estudo não apresentavam ectoparasitas e não há comprovação de que pulgas ou carrapatos contribuam na transmissão das *Leishmania*

spp., entretanto, eles funcionam como sentinelas ou indicam a circulação do parasita em áreas de risco (Morais et al., 2013a; Moraes et al., 2013b).

Nos resultados moleculares, 10 animais não tiveram nenhum resultado de qPCR, pois eles não tiveram suas amostras biológicas coletadas por motivos diversos, por exemplo, animal feroz que colocaria em risco a integridade dos profissionais que estavam fazendo a coleta. Esses animais foram 6 gatos e 4 cães.

Quando a razão de prevalência foi calculada em relação à positividade de todas as amostras, calculadas em paralelo, pela qPCR sobre cada característica clínica dos animais domésticos foram significativas a presença de seborreia e possuir membrana ocular de cor pálida. Estas características apresentaram o maior risco de infecção positiva para LT, com quase 3 vezes mais risco do que a condição normal de cada uma delas. Outras características, também significativas e que apresentaram maior risco de ter a infecção por LT foram ter pelo claro e curto, provavelmente são características preferenciais para o flebotomíneo. Outros fatores que aumentam o risco de o animal estar infectado com a *L. (V.) braziliensis* são: ter alopecia, ter dermatite, apresentar seborreia, apresentar mucosa ocular pálida, ter queratite, apresentar onicogribose e secreção ocular e linfadenopatia. Esta última poderá ser uma consequência e não um antecedente.

Sobre a comparação das proporções de amostras positivas nas diferentes amostras clínicas em relação aos leucócitos, houve diferença estatisticamente significativas entre leucócitos e plasma e leucócitos e *swab* de conjuntiva ocular. Em relação às amostras de leucócitos, a positividade no plasma é maior, já a positividade de *swab* de conjuntiva ocular é menor. Nas amostras de *swab* da lesão não se pode concluir que há diferença na positividade, provavelmente porque o total desse tipo de amostra é muito pequeno (n=7). Sabe-se que os parasitas são encontrados no interior das células polimorfonucleadas (Rey, 2010; Benassi, 2015; Moraes, 2015), portanto, seria mais coerente que a positividade para LT fosse maior em amostras de leucócitos do que no plasma. Entretanto, como a maioria das amostras encontrava-se hemolisada (devido à logística de coleta em ambientes com pouca infraestrutura de transporte e armazenamento, na zona rural), possivelmente o DNA do parasita que se encontrava no interior dessas células tenha sido liberado para o plasma. Por outro lado, como a qPCR

é uma técnica bastante sensível (Morais et al., 2013a; Diotallevi et al. 2020; Filgueira et al., 2020), qualquer escape de fragmentos de DNA da *L. (V.) braziliensis* pode ser detectado também no plasma. Sobre as amostras de *swab* da conjuntiva ter positividade menor que os leucócitos, pode indicar que esse não é um local de migração costumeira do parasita (Rey, 2010; Benassi, 2015; Moraes, 2015), porém, é uma amostra de fácil coleta, pouco invasiva e com algum grau de positividade.

Através da detecção de DNA pela qPCR, a amostra de plasma foi a que apresentou maior média absoluta de quantidade de DNA entre as outras amostras biológicas estudadas (leucócitos e *swab* da conjuntiva ocular). Acredita-se que, da mesma forma que anteriormente explicado, as amostras hemolisadas do sangue devem ter facilitado a circulação do DNA, ou fragmentos dele, de forma extracelular. Contudo, pode-se concluir que a amostra de sangue total periférico é mais indicada para confirmar a infecção de LT nos animais domésticos do que o *swab* da conjuntiva ocular. Entretanto, apesar de o *swab* de conjuntiva ocular ter apresentado menores concentrações de DNA do que nas amostras sanguíneas, essa amostra biológica associada à coleta de sangue total periférico acrescentou 1,5% de positividade aos exames moleculares. Então, para a confirmação de infecção por LT, a associação de duas ou mais amostras biológicas comprova-se ser mais eficaz (Rebollo et al., 2006). Isso significa que, se somente o sangue tivesse sido coletado e processado pela qPCR, quatro animais, de domicílios diferentes, seriam considerados sem infecção. Todos esses animais são cães com quantidades de DNA de *L. (V.) braziliensis* detectado na amostra de *swab* da conjuntiva, na qPCR, variando de 1.27fg a 2.62fg. Portanto, mesmo que o acréscimo tenha sido baixo (menos de 2%), o *swab* de conjuntiva ocular é uma amostra de coleta fácil, pouco invasiva e que, associado a outras amostras do mesmo animal, aumentam a sensibilidade geral do teste diagnóstico (Rebollo et al., 2006).

Quando comparamos a amostra de sangue completo (calculado em paralelo entre leucócitos e plasma) (Medronho, 2002), essa também apresentou positividade maior do que a amostra de *swab* de conjuntiva ocular. Isso deve-se, provavelmente pelas mesmas razões expostas anteriormente em relação ao plasma e leucócitos em separado (Rey, 2010; Benassi, 2015; Moraes, 2015).

Em relação aos vetores - flebotomíneos - transmissores das leishmanioses, as espécies de maior circulação nas Américas e no Brasil são *Lutzomyia whitmani*, *L. intermédica*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, *L. flaviscutellata* e *L. migonei* (Forattini, 1973). Michalski et al. (2002) relataram a importância da taxa de flebotomíneos infectados em áreas endêmicas e a identificação da *Leishmania* presente em determinadas espécies de flebotomíneos, em estudos epidemiológicos.

Nesse estudo houve predominância da *L. whitmani* como principal vetor circulante na Região Metropolitana do Recife e possível transmissor da LT. O agente etiológico da LT, transmitido por esse vetor, causa as formas clínicas cutânea e mucocutânea, sendo essa última, a mais desfigurante (Nasser *et al.*, 2017). A referida espécie de *Leishmania* é encontrada em todos os Estados do país e em todos os municípios de PE, principalmente na Zona da Mata Sul (Lima et al. 2019; Brito et al., 2012; Dantas-Torres et al., 2010; Reis et al. 2008; Brandão et al., 2003). A maioria dos flebotomíneos é encontrada nos galinheiros e estábulos do peridomicílio, cujas condições sanitárias são precárias. Os locais apresentam frequente presença de fezes de animais e entulhos e com pouca ou nenhuma limpeza no ambiente (Sales et al., 2015). A positividade dos flebotomos capturados à *L. (V.) braziliensis* na qPCR na região endêmica foi similar à de outro estudo (47,2%). Entre os flebotomos com sangue (alimentados) a positividade foi de 59,3% e nos sem sangue visível (não-alimentados) foi de 33,3%, corroborando com os achados desse estudo (Rossi et al., 2008).

No ciclo sazonal observado nesta investigação, a população de flebotomíneos foi escassa, no entanto, os casos de LT em humanos e animais domésticos continuaram surgindo. Nasser e colaboradores (2017) constataram que a LT se encontra disseminada em várias regiões do Brasil, em áreas ambientais alteradas pelo desmatamento e pelas queimadas. Esses fatores causam alteração dos hábitos alimentares de espécies silvestres de flebotomíneos e sua adaptação ao ambiente antrópico, modificando o meio ambiente e contribuindo para o surgimento de doenças. As alterações climáticas também interferem na fauna flebotomínica a nível da reprodução, abundância e comportamento alimentar, modificando a frequência da realização do repasto sanguíneo (Kovast et al., 2001; Silva et al., 2018).

De acordo com Brito *et al.* (2008), a vegetação nativa dá lugar à expansão da agricultura e da construção de moradias próximas às matas, facilita a presença do ser humano nas matas e a circulação de animais silvestres e sinantrópicos próximos às moradias, favorecendo a adaptação de espécies de flebotomíneos ao ambiente alterado, aumentando a transmissibilidade e a expansão do ciclo zoonótico da LT e promovendo o contacto entre espécies silvestres de animais e flebotomíneos infectados com *Leishmania spp* e os humanos (Silva *et al.*, 2018; Tolezano *et al.*, 2001).

A qPCR utilizada para confirmar a infecção de flebotomíneos por *L. (V.) braziliensis*, assim como a confirmação de infectividade das amostras biológicas dos animais domésticos, permite a quantificação do DNA na reação com sensibilidade analítica bastante elevada (Adams *et al.*, 2014). Esse teste detecta pequenas quantidades de DNA do patógeno, igual a 3% do DNA genômico dele, equivalente a 2fg do DNA da *Leishmania spp.* (Galletti *et al.*, 2011; Faria *et al.*, 2012). A alta sensibilidade analítica na detecção de infecção em flebotomíneos são indícios de grande relevância para a realização de estudos epidemiológicos da LT. A qPCR é uma importante ferramenta molecular para identificar e caracterizar o tipo de *Leishmania* albergada no sistema digestório dos insetos vetores da doença (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2013; Brighente *et al.*, 2017).

Segundo Loiola *et al.* (2007), a espécie *L. whitmani* é de grande importância na transmissão da LT em várias regiões do Brasil e diversas espécies de flebotomíneos são incriminadas como vetores da leishmaniose por associação à sua dominância nas áreas endêmicas para a doença. Nossos resultados mostraram positividade para *L. (V.) braziliensis* em exemplares de *L. whitmani*, o que sugere incriminação dessa espécie como possível vetor da LT nas áreas endêmicas do município de Moreno-PE.

Um inquérito entomológico, em 2001, capturou 444 exemplares de *L. whitmanni* nesse mesmo município, apresentando maior predominância da espécie em 11 Engenhos, inclusive no Engenho Jardim com: 33 espécimes capturadas no intra e 99 no peridomicílio (dados não publicados). Entre 2011 e 2012 um estudo confirmou a presença da espécie no intra e peridomicílio nos engenhos Jardim, Pinto e Furnas. Foram capturados 3.071 exemplares: 2.919 *L. whitmanni*, 122 *L. evandroi* e 30 *L. choti*.

Constatou-se que a espécie *L. whitmanni* predominava nas regiões estudadas. Das 37 espécies de flebotomíneos identificadas em PE, *L. whitmani* foi encontrada em alta frequência no intra e no peridomicílio de regiões endêmicas (Guimarães et al., 2012; Dantas-Torres et al., 2010; Brandão-Filho et al., 1999; Andrade et al., 2005).

Diante do contexto apresentado, os resultados obtidos no estudo demonstram que a epidemiologia da LT associada à *L. (V.) braziliensis* vem assumindo características distintas no decorrer do tempo nos diferentes biomas no país e em nossa região. São necessários mais estudos com maiores tamanhos amostrais especialmente em animais domésticos, para melhor conhecer o seu papel no ciclo de transmissão da doença e melhor contribuir para o combate da LT em áreas endêmicas. Com isso fica evidente a necessidade, no âmbito da Atenção à Saúde, ações que visam o esclarecimento da população da área rural, da zona metropolitana do Recife sobre o ciclo de transmissão da LT.

9. CONCLUSÃO

9. CONCLUSÃO

1. A leishmaniose tegumentar encontra-se distribuída em todos os Engenhos e área urbana do município Moreno-PE, apresentando o maior número de casos, nos indivíduos com baixo grau de escolaridade, do sexo masculino, profissionalmente ativos, portanto, se faz necessários ações que permitam a redução da ocorrência da doença no município;
2. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie causadora da LT na área de estudo;
3. *Lutzomyia whitmani* é a espécie com maior número de espécimes nas áreas de estudo;
4. Nesta investigação foi observada baixa densidade populacional de flebotomíneos, coincidindo com fortes pressões antrópicas (uso defensivos agrícolas, queimadas e desmatamentos), sugerindo que há necessidade de maiores estudos para se tentar estabelecer possíveis relações causais entre tais eventos;
5. A prevalência da *Leishmaniose (Viannia) braziliensis* em cães residentes na área de estudo é de extrema importância para estudos futuro;
6. A positividade das amostras por qPCR, dos animais domésticos (canídeos, equinos, felinos, caprinos e ovídeos) são indícios da participação desses animais na manutenção do ciclo de transmissão da LT no município do Moreno.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F. G.; MELO, F. L.; WERKHAUSER, R. P; MONTENEGRO, L; MONTENEGRO, R.; SCHINDLER, H. C. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. **Biotechniques**, v.33, n.6, p.1210-1214, 2002.

ADAMS, E. R.; GOMEZ, M. A.; SCHESKE, L.; RIOS, R.; MARQUEZ, R.; COSSIO, A.; ALBERTINI, A.; SCHALLIG, H.; SARAIVA, N. G. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. **Parasitology**, v.141, n.14, p.1891-7, 2014.

AGUIAR, G. M.; VILELA, M. L.; SOUCASAUX, T. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da serra dos Órgãos do Estado do Rio de Janeiro; V - Preferências alimentares (Diptera, *Psychodidae*, *Phlebotominae*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, n.4, p.477-479, 1986.

ALBUQUERQUE, S. C. G. Otimização de ferramentas moleculares baseadas em multiplex PCR para inclusão de controles de qualidade amostral no diagnóstico das leishmanioses. 2014, 124 p. **Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Saúde)**, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, 2014.

ALENCAR, J. E. Um caso de leishmaniose tegumentar em *Equus asinus*. In: **Congresso Brasileiro de Higiene**, 14, Niteroi, 1959.

ALMEIDA, J.V. Diagnóstico e caracterização de *Leishmania* spp em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar no estado de Roraima. 2020, 107p. **Tese (Doutorado em Biologia Parasitária)**, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BEM, C.; HERRENO, M.; DESJEUS, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; MARGRIET, DEN B. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS One**, v.7, n.5, p.e35671, 2012.

ANDRADE, M. S.; BRITO, M. E. F.; SILVA, S. T.; BRUNA, S. L.; ALMEIDA, E. L.; ALBUQUERQUE, E. L.; JÚNIOR, J. F. M.; ISHIKAWA, E.; CUPOLLILO, E.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 38, n.38, Uberaba, 2005.

ANDRADE, M. S. Avaliação da infecciosidade experimental de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos como hospedeiros reservatórios *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 117 p. **Tese (Doutorado em Saúde Pública)** Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil, 2010.

APOLINÁRIO A. E. J. Aspectos epidemiológicos e ambientais na distribuição geográfica da esquistossomose no Engenho Jardim Município do Moreno, Pernambuco. 2016, 57 p. **Monografia** (Graduação em Gestão Ambiental), IFPE, Recife, Pernambuco, 2016.

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia.VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p.115-129, jul. 1961.

ARAÚJO, D. B; NASCIMENTO, E. S; COELHO, V. A. T; SOUZA, C. G; PEREIRA, M. C. S. Perfil sociodemográfico da Leishmaniose tegumentar americana em Almenara, Minas Gerais. **PUBVET**, v.14, n.3, p.1-6, 2020.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D. Leishmaniasis in Bahia: evidence that *Leishmania amazonensis* reduces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536- 546, 1991.

BASANO, A. S.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.1-10, 2004.

BEACH, R.; KIILU, G.; LEEUWENBURG, J. Modification of sand fly biting behaviour by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.34, n.2, p.278-282, 1985.

BENASSI, J. C. Detecção de *Leishmania* spp, por PCR em tempo real em amostra de swab conjuntival de cães, gatos e equinos. 2015, 74f. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

BENASSI, J. C.; BENVENGA, G. U.; FERREIRA, H. L.; SOARES, R. M.; SILVA, D. T.; PEREIRA, V. F.; RUIZ, V. L. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n.6, p. 1058-1063, 2018.

BENGTSSON, M.; KARTSSON, H. J.; WESTMAN, G.; KUBITA, M. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.e45, 2003.

BENSOUSSAN, E.; NASEREDDIN, A; JONAS, F.; SCHNUR, L. F.; JAFFER, C. L. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.4, p. 1435-1439, 2006.

BEZERRA, R. J. S; LEON, L; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revistas Brasileiras de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.2, p.139-149, 2004.

BOITÉ, M. C.; MAURÍCIO, I. L.; MILES, M. A.; CUPOLILLO, E. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania* (*Viannia*) parasites based on multilocus sequence analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.11, p.31888, 2012.

BOITÉ, M. C.; OLIVEIRA, T. S.; FERREIRA, G. E. M.; TRANNIN, M.; SANTOS, B. N.; PORROZZI, R.; CUPOLILLO, E. Polymorphisms and ambiguous sites present in DNA sequences of *Leishmania* clones: Looking closer. **Infection, Genetics and Evolution**, v.25, p.110–116, 2014.

BONI, S. M. Avaliação de método diagnóstico não invasivo para leishmaniose tegumentar americana através da reação em cadeia de polimerase. 2016, 93 p. **Tese (Doutorado)**, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2016

BRANDÃO-FILHO, S. P.; CARVALHO, F. G.; BRITO, M. E. F.; ALMEIDA, F. A.; NASCIMENTO, L. A. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in ‘Zona da Mata’ Region. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.445-449, 1994.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E. F.; MARTINS, C. A. P.; SOMMER, I. B.; VALENÇA, H. F.; ALMEIDA, F. A.; GOMES, J. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p.575-576, 1998.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; LENDRUM, D. C.; 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**, v.93, p.488-494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, 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**, v.97, n.3, p.291-296, 2003.

BRANDÃO FILHO, S. P.; DONALISIO, M. R.; SILVA, F. J.; VALENÇA, H. F.; COSTA, P. L.; SHAW, J. J.; PETERSON, A. T. Spatial and temporal patterns of occurrence of *Lutzomyia* sand fly species in an endemic area for cutaneous

leishmaniasis in the Atlantic Forest region of northeast Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v.36, p.71-76, 2011.

BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6º ed. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, p.444-466, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral**, p.120, Brasília, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. 182p, Brasília, DF, ed. do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª. ed. 816p. Brasília, DF, ed. do Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. 180p, Brasília, DF, ed. do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Sistema de informação de agravos de notificação** – SINAN, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis). **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [Internet]. Ministério da Saúde, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

BRAZIL, R. P.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; MACAU, R. P. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de leishmaniose tegumentar

americana na Ilha de São Luiz, Maranhão. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.82, n.1, p.145, 1987.

BRESCIANI, K. D. S.; SERRANO, A. C. M.; MATOS, L. V. S.; SAVANI, E. S. M. M.; D'AURIA, S. R. M.; PERRI, S. H. V.; BONELLO, F. L.; COELHO, W. M. D.; AOKI, C. G.; COSTA, A. J. Occurrence de *Leishmania* spp. In domestic cats from Araçatuba, São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.2, p.127-9, 2010.

BRIGHENTE, K. B. S.. Identificação por PCR de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania (Leishmania) infantum* em uma micro-área do município de Dracena, São Paulo. 2017, 94p. **Tese (Mestrado em Ciências - Doenças Tropicais e Saúde Internacional)**, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, 2017.

BRILHANTE A. F.; MELCHIOR L. A. K.; NUNES V. L. B.; CARDOSO C. O.; GALATI, E. A. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in an endemic area of forest extractivist culture in western Brazilian Amazonia, **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.59, e 12, 2017.

BRITO, M. E. F.; MENDONÇA, M. G.; GOMES, Y. M.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. C. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n.2, p.318-321, 2000.

BRITO, M. E. F.; SILVA, C. J.; SILVA, C. M.; SALAZR, P. R.; COUTINHO, J. S.; REIS, L. C.; PEREIRA, V. R. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; MEDEIROS, A. C. R. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.10, p.2445-2448, 2008.

BRITO, M. E. F.; ANDRADE, M. S.; MENDONÇA, M. G.; SILVA, C. J.; ALMEIDA, E. L.; LIMA, B. S.; FÉLIX, S. M.; ABATH, F. G. C.; GRAÇA, G. C.; PORROZZI, R.; ISHIKAWA, E. A.; SHAW, J. J.; CUPOLILLO, E.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Species

diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil.

Tropical Medicine and International Health, v.14, n.10, p.1278–86, 2009.

BRITO, M. E. F.; ANDRADE, M. S.; DANTAS-TORRES, F.; RODRIGUES, E. H. G.; CAVALCANTI, M. P.; ALMEIDA, A. M. P.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, p.425-429, 2012.

BRITO, M. E. F. Contribuição para o conhecimento de aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco: avaliação do uso associado de método de coleta não invasivo e a técnica de PCR, para o diagnóstico da doença. 2013. 125 p. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)**, Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.

BRITO, M. E. F.; ALMEIDA, E. L.; MEDEIROS, A. C. R.; WERKHAUSER, R. P.; ALEXANDRE, J. R. A.; SÁ, B. S. L. F.; RODRIGUES, E. H. G.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.113, n.4, 2018.

BURZA S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v.392, n.10151, p.951-70, 2018.

CAMARGO, L. M. A; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v.1, p.7-34. 2003.

CAMARGO, L. M. A.; BASANO, S. D. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, n.3, v.7, 2004.

CAVALCANTI, M. DE P. Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* (*Leishmania*)

infantum em cães. 2008. 138 p. **Tese (Doutorado em Saúde Pública)**, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil, 2008.

CERVERA, E. N. L.; NARVAEZ, F. A. The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. **Acta Tropica**. v.207, p.105456, 2020.

COELHO, L. I. A. R. C. Caracterização de *Leishmania* spp. Em amostras isoladas de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da região norte, 2010, 108 p. **Tese (Doutorado em Saúde Pública)**, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

CORVALAN, F. H. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.17, p.98-102, 2011.

COSTA, J. M. L.; SALDANHA, A. C.; NASCIMENTO, D.; SAMPAIO, G.; CARNEIRO, F.; LISBOA, E.; SILVA, L. M.; BARRAL, A. Clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the tegumentary leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, (Supl 3), p.70-83, 2009.

COSTA, P. L. Comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica para leishmaniose visceral no município de Passira, agreste de Pernambuco, p. 92 folhas, **Tese (Doutorado em Saúde Pública)**, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brasil, 2011.

COUTINHO, S. G.; PIRMEZ, C.; MENDONÇA, S. C. F.; CONCEIÇÃO, S. F.; DOREA, R. C. C. Pathogens in immunopathology of leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.82 (Supp), p.214-228, 1987.

CPRM. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea Pernambuco. **Diagnóstico do Município de Moreno**. 11p, 2005.

CUBA, C. A. C.; MARSDEN, P. D.; BARRETO, A. C.; ROCHA, R.; SAMPAIO, R. R.; PATZLAFF, L. Parasitologic and immunologic diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v.15, n.3, p.249-259, 1981.

CUBA, C. C. A.; NETTO, E. M.; MARSDEN, P. D.; ROSA, A. C.; CUENTAS, L.; COSTA, J. L. M. Cultivation of *Leishmania braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, p.456-457, 1986.

CUPOLILLO, E; GRIMALDI, G; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, p.296-311, 1994.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEM, H.; BEVERLEY, S.M. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.73,n.1-2, p.145-55, 1995.

CRUZ, M. A.; RANGEL, E. F.; GARCIA, L.; FERNANDEZ, E.; MOMEM, H.; FILHO, G. G.; VARGAS, Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.19-28, 1989.

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRITO, F. L. C.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Revista Clínica Veterinária**, v.11, n.61, p.32-40, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; ANDRADE, A. J.; TENÓRIO, K. E. R.; FILHO, J. D. A.; BALBINO, V. Q.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Phetobomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phebotominae) in the state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43 n.6, p.1-4, 2010.

DATASUS, Tecnologia da Informação a Serviço do SUS/SINAN. Ministério da Saúde do Brasil. 2020 (consultado a 4 de maio de 2021 <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>).

DE BRUIJN, M. H.; BARCKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropical**, v.52, p.45-58, 1992.

DE BRUIJN, M. H. The comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, v.44, p.201-207, 1993.

DE QUEIROZ, R. G.; VASCONCELOS, I. A.; VASCONCELOS, A. W.; PESSOA, F. A.; SOUSA, R. N.; DAVID, J. R. Cutaneous leishmaniasis in Ceara State in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, p.693-698, 1994.

DESJEUX, P. Aspects de Santé publique et lutte. In: DEDET, J. P. Les Leishmanioses. Paris: AUPELF-UREFF-Ellipses, p.219-238, 1999.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis world-wide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.239-243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.27, n.5, p.305-318, 2004.

DIOTALLEVI, A.; BUFFI, G.; CECCARELLI, M.; NEITZKE-ABREU H. C.; GNUTZMANN, L. V.; LIMA, M. S. C.; DOMENICO, A.; SANTI, M.; MAGNANI, M.; GALLUZZI, L. Real-time PCR to differentiate among *Leishmania* (*Viannia*) subgenus, *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: Application on Brazilian clinical samples. **Acta Tropica**, v.201, p.105178, 2020.

DUNAISK, M. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na região do Vale do Ribeira Paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais? [**Dissertação de mestrado**]. Curitiba: Setor de ciências agrárias da Universidade Federal do Paraná, 2006.

ERAZO, A. C. O.; DE LIMA, M. A. M.; DO VALE, F. A. F.; PIMENTEL, M. A. S. Amazônia oriental e Andina segundo o “barômetro da sustentabilidade”: Esmeralda (Equador) e Bragança (Brasil). **Revista Brasileira de Desenvolvimento Regional**, v.8, n.3, 2020.

FALQUETO, A.; COURA, J. R.; BARROS, G. C.; GRIMALDI-FILHO, G.; SESSA, P. A.; CARIAS, V. R. D.; JESUS, A. C.; ALENCAR, J. T. A. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.155-163, 1986.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 3 (2): 47-57, 2012.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v.18, p.7061-1067, 2004.

FIGUEIREDO, F. B.; BONNA, I. C. F.; NASCIMENTO, L. D.; DA COSTA, T.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T. V.; AMENDOEIRA, M. R. R.; MADEIRA, M. F. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cassia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. **Revista da Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.141-5, 2009.

FILGUEIRA, C. P. B.; MOREIRA, O. C.; CANTANHÊDE, L. M.; FARIAS, H. M. T.; PORROZZI, R.; BRITTO, C.; BOITÉ, M. C.; CUPOLILLO, E. Comparison and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.14, n.10, p. e0008750, 2020.

FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. B. G.; RABELLO, E. X.; FERREIRA, O. A. Infecção natural de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.6, p.255-261, 1972.

FORATTINI, O. P. Phlebotominae – Leishmanioses – Bartonelose. In: **Entomologia Médica**, São Paulo: Edgard Blucher, vol. 4. 1973.

FRANÇA, C.; PARROT, L. Introduction à l'étude systématique des Diptères du genre Phlebotomus. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v.13, p.695-708, 1920.

FRANÇA, C. Notes parasitologiques. IV. Phlebotomes. **Giornale di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali**, v.3, n.17, p.22-25, 1924.

FRANÇA, C.; PARROT, L. Essai de classification des Phlébotomes. **Archives de l'Institut Pasteur d'Afrique du Nord**, v.1, p.279-84, 1921.

FREIRE, M. L. Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DATLPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana/ Mariana Lourenço Freire. – Belo Horizonte, 2017, 101 P. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)**. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2017.

FREITAS, J. Sustentabilidade: **Direito ao Futuro**. 3. ed. Belo Horizonte: Fórum, 2016.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. CENEPI. Série histórica de casos de agravos e doenças e parasitárias: leishmaniose tegumentar. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.6, n.1, p.60, 121-123, v. 6, n. 2, p. 128- 130, v. 6, n. 3, p. 134-136, 1997.

GALLETTI, E.; BONILAURI, P.; BARDASI, L.; FONTONA, M. C.; RAMINI, M.; REZI, M.; DOSA, G.; MERIALDI, G. Development of a minor groove binding probe

based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.243-5, 2011.

GONÇALVES, T. B. Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade Leishmanicida do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. frente à *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. 2017, 138 p. **Tese (Doutorado em Biotecnologia)**, Universidade Federal do Ceará- Fortaleza, 2017.

GONTIJO, B; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.71-80, 2003.

GONTIJO, B. B.; PAVÃO, F. F.; SILVA, F. S. A.; SILVA, S. D.; TAVARES, G. C.; COELHO, G. L. Esporotricose e Leishmaniose Tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. **PUBVET**, v.5, n. 8, Ed. 185, Art. 1250, 2011.

GOTO, H; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.8, n.4, p.419-433, 2010.

GOTO, H; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.26, n.2, p.293-307, 2012.

GUIMARÃES, L. R. M.; MACHADO, P. R. L.; LESSA, H. A.; LESSA, M.; JÚNIOR, A. D.; CARVALHO, E. M. Aspecto Clínico da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, v.01, p.67-75, 2005.

GUIMARÃES, V.C.F.V.; COSTA, P.L.; SILVA, F.J.; SILVA, K.T.; SILVA, K.G.; ARAÚJO, A.I.F.; RODRIGUES, E.H.G.; BRANDÃO-FILHO, S.P.. Phebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.1, p.66-70, 2012.

HERTIG, M. A new genus of bloodsucking Psychodids from Peru (Diptera: Psychodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.41, p.8-16, 1948.

HEUSER, J. A.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; MOURA, A. B.; SANTOS, A. A.; SANTOS, E. G. D. B.; SILVA, V. I. Leishmaniose tegumentar canina no município de Balneário Camboriu, Estado de Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p.713-718, 2010.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. **Bio/Technology**, v.10, n.4, p.413-417, 1992.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5-3 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA de polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.7276-7280, 1991.

IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais [Internet]. 2019 [cited 2021 Apr 4]. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/moreno/panorama>.

INOCÊNCIO DA LUZ, R. A.; VERMEERSCH, M.; DUJARDIN, J. C.; COS, P.; MAES, L. In vitro sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.12, p.5197–5203, 2009.

KATO, K. C. Avaliação da toxicidade do antimoniato de meglumina. 2008, 101 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)**, Escola de Formação da Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP, 2008.

KILLICK-KENDRICK R.; LEANEY, A. J.; READY, P. D.; MOLYNEUX, D. H. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. **Proceeding of the Royal Society**, v.196, n.1122, p. 105–115, 1977.

KOVATS, R. S.; CAMPBELL-LENDRUM, D. H.; McMICHAEL, A. J.; WOODWARD, A.; COX, J. S. Early effects of climate change: do they include changes in vector-borne disease? **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 356, n.1411, p. 1057-1068, 2001.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.63, n.6, p.741-745, 1969.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmanias and leishmaniasis of the New World: with particular reference to Brazil. **Bulletin of the PanAmerican Health Organization**, [S. l.], v.7, p.1-19, 1973.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. **Nature**, v.273, n.56/54, p.596-600, 1978.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, W. H. R; EVANS, D. (Ed.) **Biology of the Kinetoplastida**. London Academic Press, v. 2, p. 1-116, 1979.

LAINSON, R; SHAW, J. J; POVOA, M. The importance of edentates (sloths, anteaters) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, a causative agent of “pian bois” in the north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, p.611-612, 1981.

LAINSON, R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, v.11, n.1, p.29-40, 1997.

LANDIS, J.; KOCH, G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1, p.159–74, 1977.

LENG, Y. J. The discovery of genus *Chinius* Leng, 1987 (Diptera, Psychodidae) in China and the evolution of phlebotomine sandflies. **Annual Bulletin of the Society of Parasitology**, v.38, p.8-9, 1987.

LIMA, E. B.; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.2, p.111-121, 2007.

LIMA J. Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimonial pentavalente. 2017, 146p. **Tese (Mestrado em Biologia Parasitária)**, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, RJ, 2017.

LIMA, K. P. B. Detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* através de PCR convencional e qPCR em amostras de saliva de pacientes de região endêmica do estado de Pernambuco. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, BR-PE, 2019.

LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. Sifonápteros do Brasil. São Paulo: Ed. **Museu de Zoologia**, Universidade de São Paulo, 291p., 2000.

LOIOLA, C. F.; SILVA, D. A.; GALATI, E. A. B. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.581-585; 2007.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-Time PCR in virology, In: **Nucleic Acids Research**, v.30, n.6, p.1292-1305, 2002.

MACKAY, I. M. Real-Time PCR in microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.3, p.190-212, 2004.

MADEIRA, M. F.; UCHÔA, C. M. A.; LEAL, C. A.; SILVA, R. M. M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C. M.; SERRA, C. M. B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.551-555, 2003.

MAIA, J. A.; MENEZES, F. A.; SILVA, R. L.; SILVA, P. J. C. B. Característica sociodemográficas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. **Revista Enfermagem Contemporânea**, v.6, n.2, p.114-121, 2017.

MARINHO-JÚNIOR, J. F. Caracterização da infecciosidade de roedores silvestres e sinantrópicos como hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo zoonótico da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 102 p. **Tese (Doutorado em Saúde Pública)**, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil, 2015.

MARTINS, L.; ALEXANDRINO, A. A.; GUIMARÃES, G. Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American tegumentary of the leishmaniasis patient. **Revista de Saúde Pública**, v.44, n.3, p.1-4, 2010.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.63, p.82-104, 1992.

McNELLY, J. The CDC Trap as a Special Monitoring Tool. In: **Proceedings of the Seventy-Sixth Annual Meeting of the New Jersey Mosquito Control Association**. p. 26–33, 1989. Available from: <http://www-rci.rutgers.edu/~insects/cdctrap.htm>

MEDEIROS, A.C.R.; ROSELINO, A. M. F. Leishmaniose Tegumentar Americana: Do Histórico aos dias de hoje. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.74, n.4, p.329-336, 1999.

MEDRONHO, R. A.; CARVALHO, D. M.; BLOCH, K. V.; LUIZ, R. R.; WERNECK, G. L. **Epidemiologia**. Ed. Atheneu. São Paulo, p.493, 2002.

MELO, M. G. N.; MORAIS, R. C. S.; GOES, T. C.; SILVA, R. P.; MORAIS, R. F.; GUERRA, J. A. O.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; CAVALVANTI, M. P. Clinical and epidemiological profiles of patients with American cutaneous leishmaniasis from the states of Pernambuco and Amazonas, Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v.53, p.e20200083, 2020.

MELLO, G.B. Verificação da infecção natural do gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Brasil Médico**, v. 54, n.12, p. 180, 1940.

MENDES, A. P. O.; OLIVEIRA, B. C.; PEREIRA, A. M.; CASTRO, M. C. A. B.; SOUZA, M. A.; BRITO, M. E. F.; ARAÚJO, F. F.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, V. R. A. American tegumentary leishmaniasis diagnosis using *L.(V.)braziliensis* fixed promastigotes: a comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification. **BMC Infectious Diseases**, v.19, p.1015, 2019.

MENDONÇA, M. G.; BRITO, M. E. F.; RODRIGUES, E. H. G.; BANDEIRA, V.; JARDIM M. L.; ABATH, F.G.C.. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after cure of American cutaneous leishmaniasis: Is there a sterile cure? **The Journal of Infectious Disease**, v.189, n.6, p.1018- 1023, 2004.

MENEZES, J. A. Leishmanioses: estudos epidemiológicos e o conhecimento da população de Formiga, Minas Gerais / Júlia Alves Menezes. – Belo Horizonte, 2014, 107 P. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)**. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas do René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2014.

MENZEL, S.; U. BIENZLE. Antibody responses in patients with cutaneous leishmaniasis of the Old World. **Tropenmedizin und Parasitologie**, v.29, p.194-7, 1978.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Díptera: Psychodidae:

Phlebotominae) **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, p.255- 259, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de **Vigilância Epidemiológica**. 5. Ed. Brasília, v.2, Versão revisada e ampliada, em editoração, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Acessado em 26 de março de 2021. Disponível em: TabNet Win32 3.0: **Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação** – Pernambuco, Brasil (datasus.gov.br).

MONTENEGRO, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. **Archives of Dermatology and Syphilis**, v.13, p.187-184, 1926.

MORAIS, R. C. S. Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania*, 2015, 62p. **Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Saúde)**. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-CpqAM/FIOCRUZ, Recife, 2015.

MORAIS, R. C. S.; GONÇALVES, S. C.; COSTA, P. L.; SILVA, K. G.; SILVA, F. J.; SILVA, R. P.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; DANTAS-TORRES, F. P. C.; CAVALCANTI, M. P. M. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental and Applied Acarology**, v.59, p.473–481, 2013a.

MORAIS, R. C. S.; GONÇALVES, A., CUNHA, S.; SILVA, R. P. C.; COSTA, P. L.; SILVA, K. G.; SILVA, F. J.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; DANTAS-TORRES, F. P. C.; CAVALCANTI, M. P. Detection and quantification of *Leishmania braziliensis* in ectoparasites from dogs. **Veterinary Parasitology**, v.196, n.3-4, p.506–508, 2013b.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, n. 3–4, p.245–52, 2007.

MOTA, R. N. Turismo e desenvolvimento em Moreno-PE: o programa agroecoturístico e as suas possibilidades concretas de mudança social. 2004, 118 p. **Dissertação (Mestrado em Gestão e Políticas Ambientais)**, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife, 2004.

MURICY, V. C.; SILVA, A. F.; GUIMARÃES, M. G. S.; BASTOS, P. R. J.; SANTOS, A. C. S.; ANDRADE, P. H. A.; SILVA, N. M. Leishmaniose tegumentar americana: perfil e controle da doença no extremo oeste do Brasil. **Scientia Naturalis**, v.3, n.1, p.56-70, 2021.

NASSER, N; WILL, E. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana no município de Blumenau-SC. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.46, n.3, p.28-38, 2017.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. Uma enovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Biotecnologia, Ciências & Desenvolvimento**, v.33, p.10-13, 2004.

NYGREN, J.; SVANVIK, N.; KUBISTA, M. The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. **Biopolymers**, v.46, p.39-51, 1998.

OLIVEIRA, T. M. S. PCR em tempo real: métodos e aplicações. 2010.p.111, **Dissertação** Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, Portugal, 2010.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; DANTAS-TORRES, F.; GONÇALVES-ALBUQUERQUE, S.C.; SILVA-MORAIS, R.C.; BRITO, M.E.; OTRANTO, D.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**, v.27, n.3–4, p.122–8, 2013.

PARAGUASSU-CHAVES, C. A. Geografia Médica ou da Saúde (Espaço e doença na Amazônia Ocidental). Rondônia: **Edufro**; 2001.

PASSOS, V. M.; BARRETO, S. M.; ROMANHA, A. J.; KRETTLLI, A. U.; VOLPINI, A. C.; GONTIJO, C. M. F.; FALCÃO, A. L.; LIMA-COSTA, M. F. F. Leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34. n. 1, p. 5-12, 2001.

PEIXOTO, C. O. Saúde, ciência e desenvolvimento: a emergência da leishmaniose tegumentar americana como desafio médico-sanitário no Amazonas. **Revista História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v.27, n.3, p.741-761, 2020.

PEREIRA, A. M. S.; OLIVEIRA, B. C.; MENDES, A. P. O.; PEREIRA, V. R. A. O uso da citometria de fluxo como critério de cura e aplicabilidade diagnóstica na leishmaniose tegumentar americana (LTA). **Brazilian Journal of Health Review**, v.2, n.1, p.203-213, 2019.

PEREIRA, A. M. S. Avaliação de imunoenzaios para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar utilizando peptídeos e proteínas prediais *in silico*, 2021, 147 p. **Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica)**, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 2021.

PEZENTE, L; BENEDETTI, M. Epidemiological profile of American cutaneous Leishmaniasis in the State of Roraima, Amazonia, Brazil, between 2007 and 2016. **Brazilian Journal of Health Review**, v.2, n.3, p.1734–42, 2019.

PIRAJÁ, G.V.; SILVA, D. T.; PERUCA, L. D. B.; ALVES, M. F.; PAIXÃO, M. S.; LUCHEIS, S. B.; SANTOS, W. J.; GUIRALDI, L. M. Leishmaniose felina: Revisão de Literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.2, p. 203-216, 2013.

PITTNER, E.; VOLTARELLI, E.; PERLES, T. F.; ARRAES, S. M. A. A.; SILVEIRA, T. G. V.; LONADORNI, M. V. C. Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de

área endêmica no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.561-565, 2009.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.937-954, 2009.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELO, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; JÚNIOR, H. F. A.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v.26, n.4, p.550-555. 2003.

READY, P.; RIBEIRO, A.L. Presence of *Psychodopygus wellcomei*: a proven vector of *Leishmania braziliensis* in Ceará State. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, p.235-6, 1983.

REBOLLO, M. J.; GARRIDO, R. S. J.; FOLGUEIRA, D.; PALENQUE, E.; PEDROCHE, C. D.; LUMRAS, C.; AGUADO, J. M. Blood and urine samples as useful sources for direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.56, n.2, p.141-146, 2006.

REIS, L. C.; BRITO, M. E. F.; ALMEIDA, E. L.; FÉLIX, S. M.; MEDEIROS, A. C. R.; SILVA, C. J.; PEREIRA, V. R. A. Clinical, epidemiological and laboratorial aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.5, p. 439-43. 2008.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. C.; COURTENAY, O.; DAVIES, C. R. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in domestic dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1486-1493, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.7, n.9, p.581- 596, 2007.

REY, L. Leishmaníases. *In: Parasitologia Médica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 227-239. 2010.

ROCHA, T. J. M.; BARBOSA, A. C. A.; SANTANA, E. P. C.; CALHEIROS, C. M. L. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.6, n.4, p.49–54, 2015.

RODRIGUES, E. H. G.. Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. 2000. 72 f. **Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)** - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2000.

RODRIGUES, E. H. G.; BRITO, M. E. F.; MENDONÇA, M. G.; WERKHÄUSER, R. P.; COUTINHO, E. M.; SOUZA, W. V.; MILITÃO, M. F.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.3572-3576, 2002.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I.; MARÍN, C.; VARGAS, F.; CÓRDOVA, O.; BARRERA, M.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, R.; ALUNDA, J. M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. **Experimental Parasitology**, v.112, p.44-51, 2006.

RONDANI, C. Sopra una specie di insetto dittero. **Memoria prima per servire alla Ditterologia italiana**. Stamperia Donati, Parma, 16 pp., pl. I, 1840.

ROSSI, E.; BONGIORNO, E.; CIOLLI, T.; DI MUCCIO, A.; SCALONE, M.; GRAMICCIA, L.; GRADONI, M. M. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, *Psychodidae*) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. **Acta Tropica**, v.105, n.2, p.158-165, 2008.

SALDANHA, L. S. Políticas Públicas, aroecoturismo e desenvolvimento sustentável no município do Moreno: uma visão dos seus stakeholders acerca do processo de implantação. 2003, 152 p. **Tese (Mestrado em Gestão Pública para o Desenvolvimento do Nordeste)**, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 2003.

SALES, K. G. da S. PCR em tempo real para caracterização de fontes alimentares de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae). **Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociência e Biotecnologia em Saúde)** Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, 66p. Recife-PE, 2015.

SALLES, N. R. Casos Humanos autóctones da leishmaniose tegumentar americana no município de Moreno, Estado de Pernambuco, 42p. **Monografia (Especialização em Análise Clínica)**, Faculdade Paula Franssinetti do Recife –FAFIRE, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 628 p., 1989.

SANTOS, R. V.; COIMBRA, JR. C. E. A. **Saúde e Povos Indígenas**. Rio de Janeiro: 1994, Ed. FIOCRUZ; 1994.

SARAIVA, L.; REIS, A. S.; RUGANI, J. M. N.; PEREIRA, S. P.; RÊGO, F. D.; LIMA, A. C. V. M. R.; GONTIJO, C. M. F.; FILHO, J. D. A. Survey of sand flies (Diptera: *Psychodidae*) in an environmentally protected area in Brazil. **Plos One**, v.10, n.8. p.e0134845, 2015.

SASSI, A.; LOUSIR, H.; SALAH, A.; MOKNI, M.; OSMAN, A.; DELLAGI, K. Leishmania skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. **Clinical Experimental Immunology**, v.116, p.127-132, 1999.

SAUNDERS, N. A. Real-Time PCR. **Methods in Molecular Biology**, v.266, p.191-211, 2004.

SCHUBACH, A.; HADDAD, F.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; DEGRAVE, W.; PIRMEZ, C.; GRIMALD, JR. G.; FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v.178, n.3, p.911-914, 1998.

SERRA, C. M. B.; LEAL, C. A.; FIGUEIREDO, F.; SCHUBACH, T. M.; DUARTE, R.; UCHÔA, C. M. A.; SILVA, R. M. M.; MADEIRA, M. F. Leishmaniose tegumentar canina em morada das Águias (Serra da Tiririca), Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v.19, n.6, p.1877, 2003.

SHAHBAZI, F.; SHAHABI, S.; KAZEMI, B.; MOHEBALI, M.; ABADI, A. R.; ZARE, Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. **Parasitology Research**, v.103, p.1159–1162, 2008.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Some observations on intradermal reaction different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.69, n.3, p.323-335, 1975.

SILVA, A. B.; SILVA, A. C. O.; LEADEBAL, O.D.C.P.; FREIRE, M. E. M. Qualidade de vida relacionada à saúde de pessoas com Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.22, n.63454, p.1-11, 2020.

SILVA, A. O da. Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Leishmania (Viannia)* spp. 2017. p 77. **Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde)**. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

SILVA, C. J. Estudo de prevalência de leishmaniose tegumentar americana em duas localidades do município de Moreno, Estado de Pernambuco. 2001. **Dissertação (Especialização em Programação de Ensino em Ciências Biológicas)**. Faculdade Integrada da Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil, 2001.

SILVA, C. J. Levantamento da fauna de culicídeos em áreas urbanizadas, ecotonal e de reserva permanente no município de Moreno-PE. 2008. 41 p. **Tese (Mestrado em Tecnologia Ambiental)**. Instituto Tecnológico de Pernambuco-ITEP, Recife, 2008.

SILVA, C. J.; PEREIRA, S. V.; APOLINÁRIO, E. V.; SANTOS, G. L.; MELO-SANTOS, M. A. V.; SILVA, A. F.; WALLAU, G. L.; OLIVEIRA, C. M. F. Culicidae fauna (Diptera: *Culicidae*) survey in urban, ecotonal and forested areas, from the Moreno municipality – Pernambuco state, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.51, n.4, p.523-527, 2018.

SILVA, E. S.; PIRMEZ, C.; GONTIJO, C. M. S.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeast Brazil. **Veterinary Record**, v.147, p.421-422, 2000.

SILVA-FILHO, R. A.; OLIVEIRA, D. R.; DUTRA, V. B. P.; MEIRELES, N. M.; ANJOS, L.; MOURA, G. M. R. Tratamento das lesões causadas pela leishmaniose tegumentar. **Revista Liberum Acessum**, v.3, n.1, p.29-36, 2020.

SILVA-JUNIOR, S.; LIMA, C.; SILVA, A.; SILVA, A.; LEAEBAL, O.; FREIRE, M. Health-related quality of life of people with American tegumentary leishmaniasis. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.22, p.63454, 2020.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, I. L.; DE SOUZA, A. A.; ISHIKAWA, P. A.; BRAO, R. Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.35, p.735-738, 1991.

SILVEIRA, T. G. V.; BARBOSA, O. C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do estado do Pará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.12, n.2, p.141-147, 1996.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.49, n.1, p.55-60, 2003.

SOARES, I. R.; SILVA, S. O.; MOREIRA, F. M.; PRADO, L. G.; FANTINI, P.; MARANHÃO, R. P. A.; SILVA-FILHO, J. M.; MELO, M. N.; PALHARES, M. S. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v.197, n.3/4, p.665-669, 2013.

SOLANO P.; DUVALLET G.; DUMAS V.; CUISANCE D.; CUNY G.. Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). **Acta Tropica**, v.65, n.3, p.175–80, 1997.

SOTTO, M. N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; DA MATA, V. L.; DE BRITO, T. Cutaneous leishmaniasis PF the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. **Acta Tropica**, v.476, p.121-30, 1989.

SOUSA, R. L. T. Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Altos, Piauí: Estudo dos vetores e sua fonte alimentar. **Tese (Mestrado)**. Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical. Teresina, 2018.

SOUZA, C. F.; QUARESMA, P. F.; FILHO, J. D. A.; BEVILACQUA, P. D. Phlebotomine fauna in the urban area of Timóteo, State of Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v.134, p.72-79, 2014.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v.9, p.1729-1733, 2004.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v.44, n.2, p.253–72, 2020.

TOLEZANO, J. E.; TANIGUCHI, H. H.; ELIAS, C. R.; LAROSA, R. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.1, p.47-51, 2001.

VAN-DER-LUGT, J. J.; CARLYON, J. F.; DE WAAL, D. T. Cutaneous leishmaniasis in a sheep. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.63, n.2, p.74-77, 1992.

VASCONCELOS, I. A.; VASCONCELOS, A. W.; FILHO, N. M. F.; QUEIROZ, R. G.; SANTANA, E. W.; BOZZA, M.; SALLENAVE, SM.; VALIM, C.; DAVID, J. R.; LOPES, U. G. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite Northeast Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, p.158-164, 1994.

VASCONCELOS, J. M.; GOMES, C. G.; SOUSA, A.; TEIXEIRA, A. B.; LIMA, J. M. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.50, n.3, p.221-227, 2018.

VEDOVELLO-FILHO, D.; JORGE, F. A.; LONARDONI, M. V.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V. American cutaneous leishmaniasis in horses from endemic areas in the north-central mesoregion of Paraná State, Brazil. **Zoonoses Public Health**, v.55, n.3, p.149-155, 2008.

VEJA-LOPES, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.16, n.2, p.97-101, 2003.

VEXENAT, J. A. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia. III Fauna flebotomínica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.293-301, 1986.

VIEIRA, A. F.; ALVARENGA, T. F. F.; OLIVEIRA, S. F. C.; COELHO, E. C.; TEIXEIRA, M. C.; MOSCON, L. A.; RONDON, D. A.; PEREIRA, C. M. Leishmaniose em equídeos: Revisão. **PUBVET**, v.14, n.8, a 631, p.1-5, 2020.

ZANZARINI, P. D.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; O, DE O.; POIANE, L. P.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V. Leishmaniose tegumentar Americana canina em município do norte do Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, p.109-118, 2005.

ZIPPER, H.; BUTA, C.; LÄMMLE, K; BRUNNER, H; BERNHAGEN, J.; VITZTHUM, F. Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.1-16, 2004.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**. v.54, p.1-881, 1994.

WALTON, B. C; SHAW, J. J.; LAIN-SON, R. - Observations on the in vitro cultivation of leishmania braziliensis. **The Journal of Parasitology**, v.35, n.6, p.63, 1977.

WEIGLE, K. A.; SARAIVA N.G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinical Dermatology**, v.14, n. p. 433-450, 1996.

WERNECK, F. L. Contribuição ao conhecimento dos Mallophagos encontrados nos mamíferos sul-americanos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.31, n.3, p.391-589, 1936.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: **First WHO Report on Neglected Tropical Diseases**, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO. **Report on Neglected Tropical Diseases**. Switzerland, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory Map Gallery**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis. Fact Sheets**. Switzerland, 2020. Accessed on April 4th, 2021. Available on: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis**: 2018. Switzerland, 2021. Accessed on December 27th, 2021. Available on: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO_CL_2018.pdf?ua=1.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. **Journal of the American Medical Association**, v.310, n.20, p.2191-4, 2013.

ANEXOS

Anexo 2. Materiais didáticos.

FERIDA BRABA

Cordel personalizado:

<https://www.youtube.com/watch?v=FqZM-QFqWnA>

Cordel escrito

<https://drive.google.com/file/d/1SwFZ-xG1GzJyoLWEPGQQ5AYbFsMqi-Ve/view?usp=sharing>

Vídeo animado

<https://www.youtube.com/watch?v=wAEIItpgOvc&t=3s>

Cartilha

https://drive.google.com/file/d/1eIx34qWiKNJxZSjpt_JpgLv7MVH00n-7/view?usp=sharing

Anexo 3 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas Humana do IAM-FIOCRUZ- PE, sob o n.º 92/2015



Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Av. Moraes Rêgo, s/n, Campus da UFPE – Cidade Universitária,
CEP.:50670-420 – Recife/ Pernambuco, Brasil

AUTORIZAÇÃO

O Serviço de Referência em Leishmaniose do Instituto Aggeu Magalhães (IAM

/FIOCRUZ), autoriza a utilização de amostras biológicas humanas para realização do projeto de doutoramento do aluno Cláudio Júlio da Silva intitulado “Eco-Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana em Áreas de colonização Antiga na Região Metropolitana do Recife-PE, Brasil”. O aluno vem cursando o doutoramento em Ecologia e Saúde Ambiental pela Universidade Fernando Pessoa (UFP), Porto, Portugal em parceria com IAM/FIOCRUZ.

Pesquisadora/ Coordenadora

Serviço de Referência em Leishmanioses-IAM-
Flocruz-PE

Anexo 4 - Aprovação e da Comissão de Ética da Universidade Fernando Pessoa,
sob o n.º SSD-18072016



Universidade Fernando Pessoa
www.ufp.pt

Exmo. Senhor
Prof. Doutor Álvaro Monteiro
Diretor da FCT

Porto, 18 de Julho de 2016

Exmo. Senhor Prof. Doutor,

A Comissão de Ética, depois de apreciado o projeto do 3º Ciclo em Ecologia e Saúde Ambiental, de Cláudio Júlio da Silva, intitulado "Eco-epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana em Áreas de colonização Antiga na Região Metropolitana do Recife, Pernambuco-Brasil, considera nada haver a opor à realização do estudo, desde que a entidade congénere no Brasil autorize a realização do mesmo, devendo apenas ser clarificada a idade dos participantes.

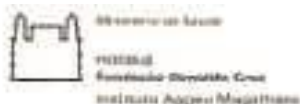
Não é necessária a ressubmissão do projeto uma vez que sejam cumpridos estes requisitos.

Com os melhores cumprimentos.

A Presidente da
Comissão de Ética


Teresa Martinho Joldy

Anexo 5 - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE, parecer n.º155/2017



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado "Eco-epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana em Áreas de colonização Antiga na Região Metropolitana do Recife - PE, Brasil." protocolado sob nº 115/2017 pelo (a) pesquisador (a) **Maria Edileuza Felinto de Brito** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM) em reunião **27/09/2017**. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 03 de outubro de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Os cães são advindos de domicílios localizados no Estado de Pernambuco e os hamsters são advindos do Biotério de criação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Cão/ cães familiares(N/A)	200 (Amostra de conveniência/ machos e fêmeas)
Hamster / Mesocricetus Auratus/ Sírio ou Golden	120 (Até 200 gr/ média de 4 semanas/ machos e fêmeas)
Total	320

Recife (PE, Brasil), 03 de outubro de 2017


 Dr Lindomar José Pena
 Coordenador CEUA/IAM

Lindomar José Pena
 Coordenador CEUA/IAM - Fiocruz
 Mar. Sup. 297543
 e-mail: lindomar.jos@fiocruz.br
 IAM / Fiocruz