



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ALBERON RIBEIRO DE ARAÚJO

**MAPA DE RISCO DAS LEISHMANIOSES EM PERNAMBUCO E A CORRELAÇÃO  
DOS CASOS HUMANOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR COM A  
DISTRIBUIÇÃO DE FLEBÓTOMOS EM TIMBAÚBA-PE**

Recife  
2020

ALBERON RIBEIRO DE ARAÚJO

**MAPA DE RISCO DAS LEISHMANIOSES EM PERNAMBUCO E A CORRELAÇÃO  
DOS CASOS HUMANOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR COM A  
DISTRIBUIÇÃO DE FLEBÓTOMOS EM TIMBAÚBA-PE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

**Área de concentração:** Parasitologia.

**Orientador:** Profº Dr Fábio André Brayner dos Santos – IAM/FIOCRUZ

**Coorientador:** Profº Dr Luiz Carlos Alves – IAM/FIOCRUZ

Recife

2020

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A663m Araújo, Alberon Ribeiro de.  
Mapa de risco das leishmanioses em Pernambuco e a correlação dos casos humanos de leishmaniose tegumentar com a distribuição de flebótomos em Timbaúba-PE / Alberon Ribeiro de Araújo. – 2020.  
100 f.: il. tab.; 30 cm.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCM.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020.  
Inclui referências e anexos.

1. Leishmaniose. 2. Leishmania braziliensis. 3. Flebótomos. 4. Distribuição espacial. 5. Moranmap. I. Santos, Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.

618.9883

CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2021-008)

ALBERON RIBEIRO DE ARAÚJO

**MAPA DE RISCO DAS LEISHMANIOSES EM PERNAMBUCO E A CORRELAÇÃO  
DOS CASOS HUMANOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR COM A  
DISTRIBUIÇÃO DE FLEBÓTOMOS EM TIMBAÚBA-PE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Aprovado em:30/11/2020

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Fábio André Brayner – Presidente da banca

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti – membro externo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Corrêa de Araújo Gomes – membro externo

---

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto – membro externo

---

Prof. Dr. Thiago José Matos Rocha – membro externo

À Patrícia, esposa amada, meu exemplo de fé e aos meus pais, Paulo e Severina, que foram a base de tudo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, minha rocha, minha fortaleza e o meu libertador; meu rochedo, meu refúgio.

À Patrícia, minha amada esposa, por todo apoio, dedicação e compreensão durante esta jornada.

À minha família, meus pais Paulo e Severina, minha filhas, Nicole e Sophie, pelo apoio e por todos os nossos momentos.

Aos meus orientadores, Dr Fabio Brayner e Dr Luiz Alves, por toda a trajetória, paciência e empenho na realização deste trabalho.

Aos que compõem os laboratórios de Leishmaniose, Biologia Celular e Molecular e Microscopia Eletrônica, por todos os momentos, amizade e alegrias, que com certeza a trajetória não seria a mesma sem vocês.

À Dr Ana Paula Feitosa, por ser minha terceira orientadora e ter incentivado em todos os momentos.

Aos agentes comunitários de saúde de Timbaúba, em especial a Fátima, e aos enfermeiros e médicos de Timbaúba sem o trabalho, sem a amizade e esforço de vocês nada teria sido feito.

À secretaria de Saúde e a Prefeitura de Timbaúba, por todo apoio em todos esses anos.

A Walter, e a todos os funcionários, professores e coordenadores do PPGMEDTROP, por compartilharem seus conhecimentos e por toda a compreensão.

A UFPE, IAM e a FIOCRUZ, instituições que tenho orgulho de fazer parte.

*“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento...” Pv 1:7*

## RESUMO

No Brasil, as leishmanioses estão presentes em todo o território sendo o estado de Pernambuco endêmico para ambas as formas da doença. Os sistemas de informações geográficas são eficazes na detecção e reconhecimento de áreas de risco para doenças transmitidas por vetores e permitem obter informações que podem auxiliar nas medidas de controle. Desta forma, buscou-se determinar as espécies de flebotomíneos, sua dispersão espacial e sua taxa de infecção por *Leishmania braziliensis*, no município de Timbaúba-PE e analisar espacialmente a incidência de LV e LTA em uma série histórica de 2009 a 2018 em Pernambuco. Amostras de sangue dos indivíduos com LTA em Timbaúba foram coletadas. Armadilhas luminosas tipo CDC foram instaladas nas residências para captura de flebotomíneos. Em laboratório, estes foram identificados e as fêmeas separadas para detecção de DNA de *Leishmania* spp por PCR. As residências de todos os indivíduos suspeitos de terem LTA foram marcados por GPS. Para a série histórica de LV e LTA em Pernambuco, utilizou-se dados provenientes das fichas de notificação no Sistema de Informações de Agravos de Notificação. Utilizou-se variáveis sociodemográficas, e as análises foram realizadas com auxílio do software *TerraView 4.2*<sup>®</sup>. Utilizou-se o índice de Moran Global como parâmetro de identificação de aglomerados. Foram capturados 3.744 flebotomos no município de Timbaúba-PE, e identificadas as espécies *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Evandromyia evandroi*, *Psychodopygus wellcomei* e *Micropygomyia quinquefer*, com a predominância de *Ny. whitmani* (84,59%). Identificou-se um pool de *Ny. whitmani* infectado com *Leishmania braziliensis*. Com os mapas georreferenciados observou-se uma maior concentração de casos de LTA tendo os hotspots do mapa de Kernel localizados em proximidade de locais com alto Índice NDVI. Foram também analisados dois bancos de dados compostos por 1.224 casos de LV e 3.675 casos de LTA. Observou-se para a LV como características principais a predominância de indivíduos do sexo masculino (64.22%), das faixas etárias de crianças (43.71%) e de adultos (41.18%), com predominância da escolaridade ensino fundamental (68.09%), sem coinfeção por HIV (63.56%) e tendo o desfecho cura (87.51%) como a característica predominante final. Para a LTA observou-se como predominantes as variáveis sexo masculino (60.16%), adultos (57.90%), ensino fundamental (74.87%), forma cutânea (96.68%) e desfecho de cura (97.99%).

Na série histórica, foi observado um aumento linear dos casos LV e uma diminuição linear dos casos de LTA em Pernambuco. O índice global de Moran obtido para LV foi de  $I = 0,35$  ( $p < 0,01$ ) e para a LTA de  $I = 0,26$  ( $p < 0,01$ ). Houve formação de clusters para a LV no Sertão e Agreste do estado e para a LTA nas Matas Norte e Sul. Sendo assim, conclui-se que o município de Timbaúba, evidencia uma relação ambiente-vetor-hospedeiro favorável à transmissão da LTA, devido a presença de flebótomos infectados, alta incidência de indivíduos infectados e habitat ideal para os flebotomíneos. Enquanto no Estado de Pernambuco, foi possível identificar os pontos de maior prioridade para ações de vigilância epidemiológica, podendo facilitar o planejamento de ações mais eficazes na prevenção e controle da LV e LTA.

Palavras-chave: Leishmaniose. *Leishmania braziliensis*. Flebótomos. Distribuição Espacial. Moranmap.

## ABSTRACT

In Brazil, leishmaniasis is present throughout the territory and the state of Pernambuco is endemic for both forms of the disease. Geographic information systems are effective in detecting and recognizing risk areas for vector-borne diseases and provide information that can assist in control measures. Thus, we sought to determine the species of sandflies, their spatial dispersion and their infection rate by *Leishmania braziliensis*, in the municipality of Timbaúba-PE and to spatially analyze the incidence of VL and ATL in a historical series from 2009 to 2018 in Pernambuco. Blood samples from individuals with ATL in Timbaúba were collected. CDC light traps were installed in homes to capture sandflies. In the laboratory, these were identified and the females separated for the detection of *Leishmania* spp DNA by PCR. The homes of all individuals suspected of having ATL were marked by GPS. For the historical series of VL and ATL in Pernambuco, data from the notification forms in the Notifiable Diseases Information System were used. Sociodemographic variables were used, and the analyzes were performed using the TerraView 4.2<sup>®</sup> software. The Moran Global index was used as a parameter for identifying clusters. 3,744 sandflies were captured in the municipality of Timbaúba-PE, and the species *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Evandromyia evandroi*, *Psychodopygus wellcomei* and *Micropygomyia quinquefer* were identified, with the predominance of *Ny. whitmani* (84.59%). A *Ny. whitmani* pool was identified infected with *Leishmania braziliensis*. With the georeferenced maps, a greater concentration of cases of ATL was observed, with the kernel map hotspots located close to places with a high NDVI Index. Two databases comprising 1,224 cases of VL and 3,675 cases of ATL were also analyzed. It was observed for VL as main characteristics the predominance of male individuals (64.22%), of the age groups of children (43.71%) and adults (41.18%), with predominance of elementary school education (68.09%), without HIV co-infection (63.56%) and with the outcome cure (87.51%) as the final predominant characteristic. For ATL, the male gender (60.16%), adults (57.90%), elementary education (74.87%), cutaneous form (96.68%) and healing outcome (97.99%) variables were predominant. In the historical series, there was a linear increase in cases of VL and a linear decrease in cases of ATL in Pernambuco. The global Moran index obtained for VL was  $I = 0.35$  ( $p < 0.01$ ) and for ATL  $I = 0.26$  ( $p < 0.01$ ). Clusters were formed for the VL in the Sertão and Agreste of

the state and for the ATL in the North and South forests. Thus, it is concluded that the municipality of Timbaúba, shows a favorable environment-vector-host relationship to the transmission of the ATL, due to the presence of infected sandflies, high incidence of infected individuals and an ideal habitat for sandflies. While in the State of Pernambuco, it was possible to identify the points of highest priority for epidemiological surveillance actions, which could facilitate the planning of more effective actions in the prevention and control of VL and ATL.

Keywords: Leishmaniasis. *Leishmania braziliensis*. Phlebotomes. Spatial distribution. Moranmap.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	22
Figura 2 -	<i>Phlebotomus papatasi</i> (Scopoli, 1786).	24
Figura 3 -	Ovos de <i>Nyssomyia whitmani</i> postos em meio artificial em laboratório.	26
Figura 4 -	Larva de <i>Nyssomyia whitmani</i> em estágio inicial em meio artificial em laboratório.	27
Figura 5 -	Lesões características de Leishmaniose Tegumentar Americana, com bordas elevadas e fundo granuloso.	32
Figura 6 -	Hepatoesplenomegalia característica da Leishmaniose Visceral em estágio terminal.	33
Figura 7 -	Representação da leishmaniose visceral no mundo em 2018.	38
Figura 8 -	Representação da leishmaniose cutânea no mundo em 2018.	39
Figura 9 -	Mapa do Município de Timbaúba – Pernambuco, Brasil.	44
Figura 10 -	Mapa do Estado de Pernambuco e suas mesorregiões.	45
Figura 11 -	Foto de pool de <i>Leishmania braziliensis</i> em lâmina submetida a soro de controle positivo para leishmaniose tegumentar pela técnica de RIFI. Aumento de 400x.	47
Figura 12 -	Modelo de armadilha luminosa do tipo CDC utilizada para capturas de flebotomíneos no município de Timbaúba-PE.	48
Figura 13 -	Instalação e remoção de armadilhas do tipo CDC com captura de flebotomíneos.	49

### Artigo 1

Figura 1 -	Distribuição espacial dos casos confirmados de LTA (pontos vermelhos) e dos suspeitos negativados para LTA (pontos azuis) no município de Timbaúba, Pernambuco.	61
Figura 2 -	Distribuição espacial dos pontos de coleta de flebotomíneos no distrito de Cruangi, Timbaúba.	63

## Artigo 2

Figura 1 -	Faixa etária versus sexo para LV (A) e LTA (B).	74
Figura 2 -	Incidência e incidência linear da leishmaniose visceral por ano (A) e por sexo e ano (B) no estado de Pernambuco, no período de 2009 a 2018.	75
Figura 3 -	Incidência e incidência linear da LTA por ano (A) e por sexo e ano (B) no estado de Pernambuco, no período de 2009 a 2018.	77
Figura 4 -	Proporção de casos de coinfeção leishmaniose visceral – HIV em Pernambuco, Brasil, no período de 2009 a 2018.	78
Figura 5 -	Número de mortes e taxa de letalidade por leishmaniose visceral em Pernambuco, Brasil, no período de 2009 a 2018.	78
Figura 6 -	<i>Moran map</i> da taxa de incidência de leishmaniose visceral em Pernambuco, Brasil, no período de 2009 a 2018.	79
Figura 7 -	<i>Moran map</i> da taxa de incidência de leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco, Brasil, no período de 2009 a 2018.	79

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1:

Tabela 1 -	Distribuição por sítio de captura de flebotomíneos no distrito de Cruangi, Timbaúba/PE.	62
Tabela 2 -	Distribuição por espécie e sexo de flebotomíneos capturados no distrito de Cruangi, Timbaúba/PE.	62

### Artigo 2

Tabela 1 -	Caracterização dos casos de LV e LTA no estado de Pernambuco, Brasil no período de 2009 a 2018.	73
------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DAT	<i>Direct Agglutination Test</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
hab.	Habitantes
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>L. (L)</i>	<i>Leishmania (Leishmania)</i>
<i>L. (V)</i>	<i>Leishmania (Viannia)</i>
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
LV	Leishmaniose Visceral
<i>Mg.</i>	<i>Migonyomyia</i>
mm	milímetro
NDVI	<i>Normalized Difference Vegetation Index</i>
<i>Ny.</i>	<i>Nyssomyia</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>Ps.</i>	<i>Psychodopygus</i>
PSG	<i>Promastigote Secretory Gel</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotações por minuto
Sb <sup>+5</sup>	Antimonial pentavalente
SDS	dodecil sulfato de sódio
SIG	Sistema de Informação Geográfica
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIRGAS	Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tris-EDTA

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1	Agentes etiológicos das leishmanioses e ciclo biológico .....	20
2.2	Vetor das leishmanioses .....	23
2.2.1	<i>Morfologia de flebotomíneos</i> .....	23
2.2.2	<i>Comportamento de flebotomíneos</i> .....	24
2.2.3	<i>Ciclo biológico de flebotomíneos</i> .....	25
2.2.4	<i>Distribuição de flebotomíneos</i> .....	27
2.2.5	<i>Taxa de infecção natural por Leishmania spp.</i> .....	29
2.3	Reservatório e hospedeiros das leishmanias .....	30
2.4	Manifestações clínicas das leishmanioses .....	31
2.5	Diagnóstico e tratamento das leishmanioses .....	34
2.6	Epidemiologia das leishmanioses .....	37
2.6.1	<i>Geoprocessamento, série temporal e produção de mapa de risco das leishmanioses</i> .....	40
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
3.1	Objetivo Geral .....	42
3.2	Objetivos específicos .....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1	Desenho do estudo .....	43
4.2	Populações da pesquisa .....	43
4.3	Áreas de estudo .....	44
4.4	Variáveis e obtenção de amostras .....	45
4.4.1	<i>Variáveis da série temporal</i> .....	45
4.4.2	<i>Coleta de amostras sanguíneas e diagnóstico sorológico para LTA ...</i>	46
4.4.3	<i>Captura e manejo de flebotomíneos</i> .....	48
4.5	Detecção da infecção natural de flebotomíneos por <i>L. braziliensis</i> .....	50
4.5.1	<i>Extração de DNA das fêmeas capturadas</i> .....	50
4.5.2	<i>Real time PCR para detectar a infecção natural de flebotomíneos por L. braziliensis.</i> .....	51
4.6	Dados para geoprocessamento .....	51

4.7	Análises estatísticas .....	52
4.8	Aspectos éticos .....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
5.1	Mapa de risco da leishmaniose tegumentar americana em uma área rural: casos humanos e ecologia de flebotomíneos no nordeste do Brasil. ....	54
5.2	Série temporal e análise espacial de casos de leishmanioses visceral e tegumentar do estado de Pernambuco, Brasil – 2009 a 2018. ....	70
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>90</b>
	<b>ANEXO A – SUBMISSÃO ARTIGO 1</b> .....	98
	<b>ANEXO B - SUBMISSÃO ARTIGO 2</b> .....	99
	<b>ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	100

## 1 INTRODUÇÃO

As Doenças Negligenciadas são de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020) um conjunto de doenças de origem infecciosa que atualmente persistem exclusivamente entre as comunidades mais pobres e negligenciadas do mundo. Dentre as doenças negligenciadas, têm-se as leishmanioses que são antropozoonoses de transmissão vetorial e que atingem regiões de clima tropical e subtropical, e são causadas por protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (BI *et al.*, 2018). É estimado que 350 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a leishmaniose e que há 2 milhões de novos casos por ano (PAHO, 2019).

As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública, indo de uma doença que pode levar ao óbito, como a leishmaniose visceral (LV) (BI *et al.*, 2018), à uma doença que causa deformidades incapacitantes, como a leishmaniose tegumentar americana (LTA) (LABOUDI *et al.*, 2018). A LV está presente em todas as regiões do Brasil, tendo uma incidência média nacional de 1,8 casos/100.000 habitantes e uma incidência média de 3,2 casos/100.000 habitantes na região nordeste (BRASIL, 2014). Outro agravante da LV é a coinfeção com o HIV, onde no Brasil a incidência desta coinfeção aumentou de 0,7% em 2001 para 8,5% em 2012 (LINDOSO *et al.*, 2016). Este fato torna-se importante devido a associação desta coinfeção com altas falhas iniciais no tratamento, recidivas, efeitos tóxicos dos medicamentos e mortalidade (LINDOSO *et al.*, 2016).

O Brasil está entre os cinco países com maior número de casos de leishmaniose tegumentar nas Américas, destacando-se as regiões Norte e Nordeste do país (BRASIL, 2017; PAHO, 2019). Entre 1990 e 2011, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2017) notificou taxas de LTA incidência nos estados variando entre 3,8 a 22,9 casos/100.000 habitantes e na região nordeste uma incidência média de 18,8 casos/100.000 habitantes.

O Estado de Pernambuco, localizado na região Nordeste do Brasil, é endêmico para ambas as leishmanioses. São notificados casos e capturas de vetores por todas as regiões do Estado (ARAUJO *et al.*, 2016; BRITO *et al.*, 2009; DANTAS-TORRES *et al.*, 2017; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; SILVA; BRAGA, 2008).

A LTA em Pernambuco está ligada principalmente a região das Matas Norte e Sul, tendo municípios com endemias bem estabelecidas (ARAUJO *et al.*, 2016; BRITO *et al.*, 2012). Em Timbaúba, município da Mata Norte, a LTA se estabelece com características típicas da doença, como a maior parte dos casos sendo ligados ao caráter rural, a profissionais do campo, a proximidade de florestas e plantações e a presença de criação de galinheiros e rebanhos próximos das residências (ARAUJO *et al.*, 2016). Essa tipicidade torna Timbaúba ideal no estudo do comportamento da LTA, sobretudo na dinâmica de seus vetores.

Portanto, sabendo que a manutenção da LTA depende dos vetores e da população de risco, e que o efetivo controle dos flebotomíneos pode levar há uma redução da incidência de casos. Torna-se importante a identificação das espécies de flebótomos envolvidas e da determinação de sua distribuição espacial associando à presença de casos visando um melhor controle da LTA nessas áreas endêmicas.

Concernente a leishmaniose visceral em Pernambuco, ela está presente em municípios considerados urbanos como Petrolina, no sertão do São Francisco (ARAUJO, A. C. *et al.*, 2016), e Goiana, na região metropolitana do Recife (SILVA *et al.*, 2019). Sendo considerado o fluxo urbano e as migrações como fatores determinantes para a expansão da LV no Estado (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; FURLAN, 2010).

Em relação a expansão da LV no estado e também da LTA, as análises baseadas em tendência temporal podem ser úteis na avaliação de estratégias e ações de vigilância e controle em doenças endêmicas, pois permitem enxergar a dinâmica da doença ao longo do tempo em termos de incidência, mortalidade e letalidade (BEZERRA *et al.*, 2018; CAVALCANTE *et al.*, 2020). Outra importante ferramenta de vigilância é o Sistema de Informação Geográfica (SIG), baseado em geoprocessamento, usado para analisar padrões espaciais de distribuição de doenças, como dengue, febre amarela, malária e leishmaniose, onde podem ser identificadas áreas de risco, fatores associados e indicando áreas prioritárias para o desenvolvimento de ações de controle (CAVALCANTE *et al.*, 2020; GUEDES *et al.*, 2017).

A utilização dessas ferramentas permite estratificar o risco da doença, que é uma importante ferramenta de vigilância, e proporciona um melhor conhecimento sobre o problema de saúde, apoiando os gestores e profissionais na adoção de ações e priorizando áreas a serem trabalhadas (PAHO, 2019). Desta maneira,

estudos regionais, voltados para problemas locais tendem a ser necessários para o efetivo controle da leishmaniose.

Assim, objetivou-se utilizar a análise espacial para o mapeamento dos casos humanos de LTA com sua caracterização biológica e aumentar o conhecimento sobre a ecologia dos flebotomíneos, a saber: a diversidade de flebotomíneos, a taxa de infecção natural e sua distribuição espacial em uma área endêmica rural no Estado de Pernambuco e ainda, analisar a tendência temporal e espacial, em um período de 10 anos (2009 a 2018), das leishmanioses no estado de Pernambuco, Brasil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Agentes etiológicos das leishmanioses e ciclo biológico

As leishmanias pertencem ao filo Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (LEVINE *et al.*, 1980), que se caracterizam por apresentarem duas formas principais em seu ciclo vital, amastigota e promastigota (com diferenciações no vetor). Enquanto parasito intracelular de hospedeiros vertebrados sua forma é arredondada e sem flagelo externalizado denominando-se amastigota. Quando se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados bem como em meios de cultura, sua forma é a promastigota e outras diferenciações, que possuem corpo alongado e flagelo na extremidade posterior (DAWIT; GIRMA; SIMENEW, 2013).

A classificação e a nomenclatura das leishmanias apresentam dificuldades em decorrência da baixa taxa de modificações genéticas, devido ao tipo de reprodução, divisão binária, tornando as espécies morfologicamente parecidas. No entanto, apesar das semelhanças morfológicas, as diversas espécies causam diferentes e peculiares manifestações da doença no hospedeiro (KAYE; SCOTT, 2011).

Algumas técnicas são utilizadas para diferenciar as espécies, como as baseadas em eletroforese de isoenzimas, restrição de fragmentos polimórficos, anticorpos monoclonais e polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (KAYE; SCOTT, 2011).

No Brasil foram identificadas sete espécies de leishmanias causadoras da LTA, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As principais espécies são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, e *L. (L.) amazonensis*, e desde 2004 as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados do Norte e Nordeste. Como agente etiológico da LV apenas a *Leishmania (L.) infantum* (BRASIL, 2017; KAYE; SCOTT, 2011).

Os parasitos do gênero *Leishmania* tem um complexo ciclo de vida com várias etapas de desenvolvimento. Por possuir dois hospedeiros em seu ciclo, a leishmania necessita se adaptar as condições diferentes dos ambientes oferecidos, de forma a ter sucesso na reprodução (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

O ciclo de vida da leishmaniasis inicia-se com a ingestão dos parasitos pelo flebótomo logo após a hematofagia, os parasitos ingeridos estão na forma amastigota que nesta ocasião medem cerca de 2.5 a 3.5  $\mu\text{m}$  (ARENAS *et al.*, 2017).

Uma vez dentro do vetor, os parasitos, apresentam as seguintes formas de desenvolvimento no intestino dos insetos: promastigotas procíclicas, promastigotas nectomonas, promastigotas paramastigotas, promastigotas haptomonas e promastigotas metacíclicas, sendo esta última com capacidade infectante (ARENAS *et al.*, 2017).

O processo de transformação das amastigotas ingeridas em promastigotas inicia-se entre 6 e 12 horas após o repasto, enquanto o sangue é envolvido por uma matriz de proteínas, glicoproteínas e quitina denominada matriz peritrófica. O desenvolvimento de formas promastigotas ocorre no flebótomo, na parte posterior do intestino para o complexo *Vianna* e na parte anterior e mediana para o complexo *Leishmania*, Essa diferença de desenvolvimento no intestino pode classificar as espécies de *Leishmania* como suprapiláricas ou peripiláricas (Figura 1) (ARENAS *et al.*, 2017; KAYE; SCOTT, 2011; PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

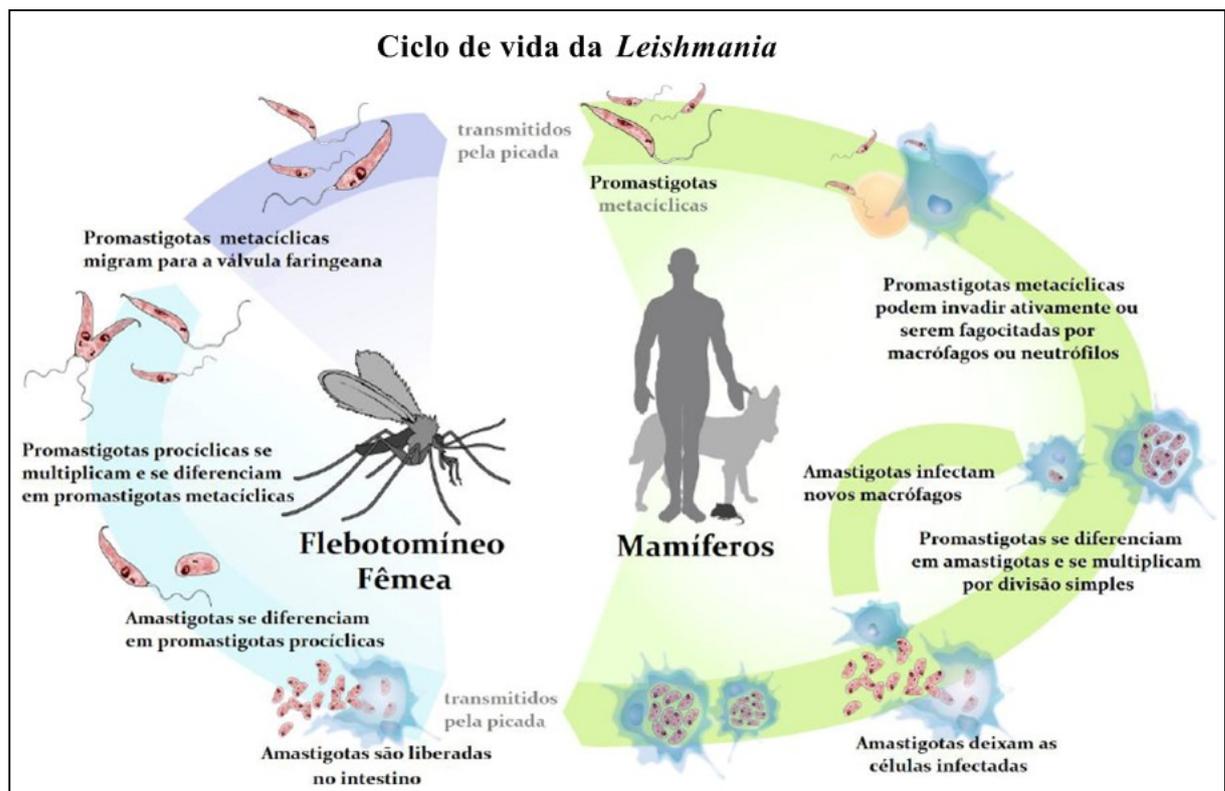
A matriz peritrófica se degenera após 2 a 5 dias, nesse tempo se inicia a excreção do bolo fecal passando pelo piloro e pelo íleo. Nesse momento já há uma intensa multiplicação das formas procíclicas e o início da diferenciação para as formas nectomonas (ROGERS *et al.*, 2004; SACKS; KAMHAWI, 2001).

No intestino anterior, os parasitos ancoram-se com o flagelo às microvilosidades do epitélio intestinal para evitar a excreção junto com o bolo fecal. Posteriormente, já diferenciados para as formas metacíclicas, que não possuem capacidade de adesão, os parasitos se desprendem do epitélio e migram para o intestino médio (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

As outras formas de leishmaniasis aparecem nesse momento da colonização do flebótomo, e secretam uma substância denominada *promastigote secretory gel* (PSG). Este tem a função de manter os parasitos embebidos e imobilizados (ROGERS *et al.*, 2004). As formas metacíclicas, após 5 dias ou mais, migram para a válvula de estomodeu, sendo parasitos altamente móveis e livres, podem migrar ao longo do intestino anterior e alcançar a faringe, cibário e probóscide, possibilitando assim a sua transmissão via picada em hospedeiro vertebrado (ROGERS *et al.*, 2004).

Quando ocorre um novo repasto, os parasitos presentes na parte anterior do intestino limitam o fluxo do sangue ingerido e causam um retorno do fluxo que, por consequência, transporta os parasitos até o aparelho bucal do inseto, podendo ficar nesta situação de 5 a 25 dias, os quais são regurgitados pela probóscide para a corrente sanguínea do hospedeiro, este podendo ser humanos, cães e outros vertebrados (ARENAS *et al.*, 2017; ROGERS *et al.*, 2004; VOLF *et al.*, 2004).

Figura 1 - Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Fonte: Villarreal (2011, com modificações).

Sucedese a fagocitose por macrófagos e a perda do flagelo do parasito, assumindo a forma amastigota. Esta sobrevive por meio de um mecanismo que inibe a resposta do tipo Th1 do hospedeiro e favorece a resposta do tipo Th2. Essa inversão de respostas impede a ativação dos macrófagos, permitindo a reprodução das formas amastigotas no meio ácido dos fagolisossomos, até provocar a lise da célula hospedeira e infectar outros macrófagos.

Neste momento há a diferenciação entre os tipos de leishmanioses. na LTA, os parasitos causadores são dermatópicos, portanto tem preferência pela derme do hospedeiro e isso é facilitado pelo tipo de resposta imune desses parasitos. Na LTA

há uma indução maior de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  pela via Th1, que aumenta a disponibilidade de células fagocitárias na derme e diminui a carga parasitária, provocando as lesões ulcerosas (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). Em outra via, a Th2, a *L. infantum*, tendo um comportamento viscerotrópico, induz a liberação de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-14, permitindo que haja menor produção de óxido nítrico e com isso diminuindo a lise pelos fagossomos e aumentando consequentemente a carga parasitária. Isto permite que a *L. infantum* se estabeleça nos órgãos do sistema fagocitário mononuclear, causando os sintomas da leishmaniose visceral (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017).

Havendo novo repasto sanguíneo pelo vetor, este ingere macrófagos infectados com amastigotas reiniciando o ciclo (DAWIT; GIRMA; SIMENEW, 2013; KAYE; SCOTT, 2011).

## 2.2 Vetor das leishmanioses

### 2.2.1 Morfologia de flebotomíneos

Os flebotomíneos pertencem à ordem Díptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, e subfamília Phlebotominae. Inicialmente, os estudos sobre a taxonomia de flebotomos eram sobre os aspectos morfológicos de espécimes mortos. Posteriormente, devido a utilização de outros métodos, tais como análise cromossômica, morfometria multivariada, colônias de laboratório, isoenzima, análise molecular, filogenética e espectrometria de massa, o conhecimento da sistemática de flebotomíneos tem aumentado (AKHOUNDI et al., 2016).

A taxonomia dos flebotomíneos pode ser dividida em dois períodos diferentes. No primeiro período, os caracteres são distinguidos de acordo com a análise de estruturas externas, como a estrutura dos órgãos genitais masculinos e as ramificações venosas das asas. O segundo período promove a descrição de estruturas internas como as espermatecas, o cibário e a faringe (AKHOUNDI et al., 2016). Essas são características que podem definir gênero e espécie, principalmente nos flebotomíneos de interesse médico (READY, 2013).

Atualmente, a classificação de flebotomos na subfamília Phlebotominae segue a proposta por Galati (2014), que subdivide em duas tribos: Hertigiini (subtribos Hertigiina e Idiophlebotomina) e Phlebotomini (subtribos Phlebotomina,

Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina). A tribo Phlebotomini possui 916 espécies válidas e 15 espécies com status taxonômico indefinido. Destas, mais de 229 já foram registradas no Brasil, representando cerca de 25% do total e 45% dos registros de espécies que ocorrem na Região Neotropical (GALATI, 2014; READY, 2013).

Os flebotomos são insetos delicados caracterizados por um corpo de pelugem densa, e quando em repouso mantêm as asas erguidas em forma de “V” (RANGEL; LAINSON, 2009). Os adultos têm tamanho de 1.5 a 3.5 mm, indo de uma coloração mais clara como nas espécies de *Phlebotomus* no velho mundo a até a cor preta como em espécies de *Lutzomyia* no novo mundo (RANGEL; LAINSON, 2009).

O aparelho bucal é curto, adaptando-se para o repasto sanguíneo nas fêmeas e para sugar os sucos vegetais nos machos. Suas antenas possuem 16 segmentos e são semelhantes em ambos os sexos, são longos, e com pequenos pelos na extremidade livre. Os flebotomos possuem também olhos grandes e suas pernas são longas e finas (Figura 2) (RANGEL; LAINSON, 2009).

Figura 2 - *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786).



Fonte: CDC/ Frank Collins, 2005. Foto: James Gathany.

### 2.2.2 Comportamento de flebotomíneos

A alimentação dos flebótomos é distinta de acordo com o sexo. Ambos os sexos se alimentam de sucos vegetais e açúcares. Adicionalmente as fêmeas dos flebotomíneos realizam o repasto sanguíneo em uma variedade de vertebrados, como os mamíferos, lagartos, anfíbios e aves. Elas alimentam-se com sangue para a maturação dos ovos (BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G., 2003; READY, 2013).

Os flebótomos adultos não são exímios voadores, na verdade eles são mais saltadores, realizando os seus saltos para a locomoção. Esse fato fica latente quando percebemos a distância que um flebótomo percorre no seu habitat, não passando de 100m do local de origem. Além disso, fêmeas de espécies como o *Phlebotomus argentipes* não ultrapassam 1,5m de altura para procurar alimento em vertebrados (BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G., 2003; READY, 2013).

No velho mundo, em regiões temperadas, os flebótomos têm um comportamento tipicamente sazonal, alcançando o pico de população no verão. No novo mundo, nos trópicos, a população de flebotomíneos tem uma menor variação sazonal (BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G., 2003; READY, 2013).

O comportamento desses insetos é crepuscular, onde suas atividades são influenciadas pela redução da luminosidade. Entretanto, os flebotomíneos podem realizar o repasto sanguíneo durante o dia, em locais com pouca luminosidade como cavernas, florestas ou cômodos escuros (BRASIL, 2017). Todavia, os flebótomos adultos abrigam-se durante o dia em locais com ausência de poças de água e com pouca ou nenhuma luz. As condições ideais para esse inseto no seu habitat envolvem a temperatura de  $\pm 26^{\circ}\text{C}$  e alta umidade relativa do ar ( $\pm 80\%$ ) (BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G., 2003; READY, 2013).

### 2.2.3 Ciclo biológico de flebotomíneos

Uma única fêmea de flebotomíneo, em condições ideais, põe cerca de 30 a 70 ovos por postura. Após o repasto sanguíneo, elas esperam de 2 a 3 dias para realizar a postura dos ovos. Cerca de uma a duas semanas depois, havendo condições ideais que incluem temperatura, umidade e matéria orgânica, as larvas eclodem dos ovos. Pouco se sabe da fase larval, por causa da dificuldade de encontrar o habitat natural das larvas de flebótomos, restando apenas as colônias de

laboratório como fonte de informação. No seguimento do seu ciclo, os flebótomos por serem holometabólicos, têm quatro estádios larvais e formam pupa antes do adulto emergir, esse período completo leva de 20 a 60 dias (BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G., 2003; READY, 2013; VOLFF; VOLFOVA, 2011).

Os ovos de flebótomos são compridos, ovais e muito diminutos, o que torna improvável seu encontro no ambiente natural. Após a postura, os ovos são amarelados e frágeis, depois de algumas horas eles tornam-se escuros e duros (Figura 3) (BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G., 2003; VOLFF; VOLFOVA, 2011). As larvas podem eclodir dos ovos em 2 a 10 dias em condições ideais do ambiente, mas em condições não favoráveis os ovos podem permanecer viáveis por até 30 dias (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Após a eclosão dos ovos, as larvas, passam a se alimentar da matéria orgânica do ambiente. No seu primeiro estágio as larvas podem ser identificadas por um par de longas cerdas caudais (Figura 4). Nos estádios consequentes as larvas adquirem um tamanho maior, no quarto estágio larval elas possuem dois pares de cerdas caudais (BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G., 2003; YOUNG; DUNCAN, 1994). Antes de virar pupa, as larvas param de se alimentar e procuram um local menos úmido para abrigo (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Figura 3 - Ovos de *Nyssomyia whitmani* postos em meio artificial em laboratório.



Fonte: acervo pessoal; Aumento 4x.

As pupas têm forma de clava e tem cerca de 3 mm de comprimento. Seu segmento posterior é coberto pela exúvia e a cabeça e o tórax são curvados para trás. As pupas se fixam ao substrato e passam cerca de 13 dias para se desenvolver em adultos (BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G., 2003; YOUNG; DUNCAN, 1994).

Os adultos têm um tempo de vida relativamente curto, de no máximo três semanas, durante os quais eles têm que se acasalar, procurar um hospedeiro vertebrado para se alimentar, e as fêmeas ainda têm que localizar um substrato adequado para a oviposição (BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G., 2003; READY, 2013; YOUNG; DUNCAN, 1994).

#### 2.2.4 Distribuição de flebotomíneos

Os flebotomos estão distribuídos em países tropicais e subtropicais (RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020). No velho mundo esses insetos distribuem-se da Europa central até o sul da Ásia, passando pelo Oriente Médio. Nessas regiões são encontrados principalmente espécies do gênero *Sergentomyia* em florestas tropicais da África, enquanto espécies do gênero *Phlebotomus* são mais populosos nas outras áreas. No novo mundo, principalmente na América Latina, as espécies do gênero *Lutzomyia* são predominantes (MOEMENBELLAH-FARD *et al.*, 2015; RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020).

Figura 4 - Larva de *Nyssomyia whitmani* em estágio inicial em meio artificial em laboratório.



Fonte: acervo pessoal. Aumento 4x.

Das mais de 900 espécies descritas de flebotomíneos (GALATI, 2014), apenas 20 espécies são implicadas como vetores da leishmaniose humana (visceral e tegumentar) (READY, 2013). No Brasil, existem duas espécies de vetores da leishmaniose visceral. A espécie vetor que classicamente transmite o parasito *L. infantum* é a *Lutzomyia longipalpis* e no estado do Mato Grosso do Sul, nos últimos anos, a *Lu. cruzi* também foi implicada como vetor da LV (BRASIL, 2014).

A *Lu. longipalpis* está amplamente distribuída no território brasileiro. Está presente em quatro regiões geográficas, exceto no Sul. Nas regiões Nordeste e Norte, essa espécie de flebótomo habitava originalmente as matas, participando do ciclo primário de transmissão da doença. Esse quadro mudou com a expansão desse flebótomo para as áreas urbanas dessas regiões, além disso, as áreas urbanas do Sudeste do Brasil também têm registro da expansão do *Lu. longipalpis* (BRASIL, 2014; CARDOSO, M. S. *et al.*, 2019; CARRO *et al.*, 2020; PIRAJÁ; LUCHEIS, 2014).

Na leishmaniose tegumentar americana, seis espécies de flebotomíneos são vetores da doença no Brasil: *Nyssomyia whitmani*, *Ny. intermedia*, *Ny. umbratilis*, *Bichromomyia flaviscutelata*, *Psychodopygus wellcomei* e *Migonemyia migonei*. Essas espécies de flebótomos preenchem os critérios que atribuem a uma espécie a competência vetorial. No entanto, a capacidade de cada uma está atrelada a qual espécie de *Leishmania* coloniza o intestino. Embora ainda não tenha sido comprovado o papel da *Ny. neivai* e *Pintomyia fischeri* como vetores da LTA, estas espécies têm sido encontradas com frequência em ambientes domiciliares em áreas de transmissão da doença (BRASIL, 2017; PIRAJÁ; LUCHEIS, 2014).

As diferentes espécies de flebotomíneos que transmitem a LTA parecem obedecer a características regionais, sendo uma determinada espécie de flebotomíneo mais abundante em uma região do que em outra. Essa implicação resulta em diversas espécies sendo vetores de um mesmo parasito, como no caso da *L. braziliensis* que tem distribuição em todo o território nacional e tem como vetores as diferentes espécies acima mencionadas. *Ps. wellcomei* é o principal vetor da *L. braziliensis*, em algumas áreas de transmissão no ambiente florestal no estado do Ceará. Nos estados da Bahia, Pernambuco, Ceará, Mato Grosso do Sul e Paraná o parasito foi isolado e caracterizado do vetor *Ny. whitmani*, e nos estados do Ceará e Rio de Janeiro da espécie *Mg. migonei*. No sul do Brasil, *Ny. neivai* é sugerido

como vetor. No Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, *Ny. intermedia* é a espécie incriminada como vetor (BRASIL, 2017; PIRAJÁ; LUCHEIS, 2014).

Saber a distribuição das espécies vetores é importante na vigilância epidemiológica da LTA. A *L. (V.) braziliensis* pode ser transmitida por vários flebotomos de espécies diferentes no Brasil, e conhecer as espécies transmissoras do parasito em determinada região coopera nessa vigilância. Se uma nova espécie for implicada na transmissão da LTA, pode-se inferir em uma mudança futura de comportamento e distribuição da doença, bem como de adaptação do ciclo da doença em um dado momento. Por outro lado, saber que as mesmas espécies ainda são implicadas como vetores e ter a certeza de sua distribuição em uma região, por meio de técnicas de geoprocessamento, possibilita o planejamento a médio prazo de ações de controle dos vetores e, conseqüentemente, da doença.

#### 2.2.5 Taxa de infecção natural por *Leishmania* spp.

A determinação das taxas de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* constitui uma importante ferramenta para os estudos epidemiológicos das leishmanioses e de competência vetorial (SOARES *et al.*, 2010). Precursoramente, a técnica da dissecação do trato digestivo do vetor e a pesquisa direta do parasito eram empregadas com esta finalidade, o que consumia mais tempo e pessoal treinado nas técnicas de dissecação (SOARES *et al.*, 2010). Entretanto, atualmente a dissecação para a determinação da taxa de infecção natural está em desuso, em decorrência da maior utilização reação em cadeia da polimerase (PCR), que tem maiores especificidade e sensibilidade (CASARIL *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, como a PCR, possibilitou a identificação de material genético de *Leishmania*, mesmo em quantidades mínimas como 50fg de DNA do parasita (CASARIL *et al.*, 2017). Trabalhos utilizando essa metodologia têm sido realizados no diagnóstico de leishmaniose bem como na identificação de reservatórios animais, detectando parasitas independentemente da abundância, estágio, local e transmissibilidade (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2019).

A determinação da taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp., auxilia no mapeamento das áreas de maior risco de transmissão. Esta taxa

varia entre 0,25 a 4,0%, o que mostra-se suficiente na manutenção da endemia ou como demonstrativo da implicação de alguma espécie de flebótomo na transmissão (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017). É extremamente importante identificar as espécies de *Leishmania* que circulam em um determinado foco de transmissão, principalmente quando o alvo é a epidemiologia da doença (MICHALSKY *et al.*, 2011).

### 2.3 Reservatório e hospedeiros das leishmanias

Os hospedeiros de *Leishmania* spp. são vertebrados, que pertencem à classe dos mamíferos, entre eles podem ser citados: roedores, edentados, marsupiais e canídeos (LIMA *et al.*, 2013). Segundo Noyes *et al.* (1998), o homem é considerado hospedeiro acidental (antropozoonose), enquanto o protozoário infecta cerca de nove ordens de mamíferos e répteis em áreas subtropicais e tropicais do mundo.

O cão é o mais importante reservatório da LV no ambiente urbano, enquanto as raposas e marsupiais estão ligados à zona rural (BRASIL, 2014). Embora ele possa ser infectado por leishmanias responsáveis por lesões cutâneas, entre as quais, *L. braziliensis*, o cão é considerado o principal reservatório da *L. infantum* em áreas endêmicas (BRUNO *et al.*, 2019).

Por serem animais domésticos os cães possuem acesso direto aos seres humanos susceptíveis, por isso tornam-se importantes pontos de vista epidemiológico. Os cães possuem um parasitismo cutâneo intenso que favorece susceptibilidade aumentada à infecção (SILVA; WINCK, 2018). Além do fato de a pele dos cães atraírem o flebótomo, é importante ressaltar que há uma prevalência maior de casos de LV em cães do que em humanos, e geralmente as infecções em humanos são precedidas de infecções caninas (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008).

Animais domésticos (caninos, felinos e equinos) podem apresentar lesões tegumentares causadas *L. braziliensis*, no entanto, por não serem capazes de manter o ciclo epidemiológico em um ecótopo, são considerados hospedeiros secundários ou acidentais (BRILHANTE *et al.*, 2016). Silva *et al.* (2005) associaram o desenvolvimento de lesões de pele nestes animais como a demonstração de não serem hospedeiros naturais do parasito. A LTA nesses animais pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes às da doença humana,

ou seja, o parasitismo ocorre preferencialmente em mucosas das vias aerodigestivas superiores (BRASIL, 2017).

Dessa forma, as alterações do meio ambiente decorrentes das ações antrópicas para a exploração de recursos naturais e agricultura, modificaram a epidemiologia da doença e, com isto, houve surgimento de novas áreas endêmicas (LAINSON; SHAW, 1998).

#### 2.4 Manifestações clínicas das leishmanioses

Dependendo do estado imunológico do hospedeiro vertebrado e da espécie de *Leishmania* envolvida, a leishmaniose tegumentar pode apresentar-se de formas cutânea, mucocutânea e disseminada. A forma cutânea pode apresentar lesão única ou múltipla, podendo estas lesões surgirem na forma clássica ou em nódulos não ulcerados. A forma clássica da lesão se inicia com uma pápula eritematosa que progride lentamente para um nódulo que frequentemente evolui para a ulceração típica da leishmaniose (Figura 5) (DESJEUX, 2004; RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020).

A úlcera clássica da LTA apresenta bordas elevadas e contornos bem definidos sendo indolor, quando não contaminada com bactérias, e fundo granuloso e pouco exsudativo. A lesão aparece geralmente entre o 10º dia até três meses após a picada do inseto vetor infectado. Em pacientes com recidivas da forma cutânea o número de lesões pode não sofrer alteração, mas as lesões são de tamanhos menores, devido a ação da imunidade adquirida na primeira infecção (DAWIT; GIRMA; SIMENEW, 2013; DESJEUX, 2004; RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Figura 5 - Lesões características de Leishmaniose Tegumentar Americana, com bordas elevadas e fundo granuloso.



Fonte: acervo pessoal

A forma mucocutânea da LTA, também conhecida como “espundia”, causa extensiva destruição oro-naso-faríngea com lesões que desfiguram e mutilam a face, tornando-a um sério problema de saúde pública. A forma disseminada, que se assemelha a doença lepromatosa com lesões nodulares e pápulas espalhadas pelo corpo, não cura espontaneamente e mesmo após o tratamento pode ocorrer o aparecimento de recidivas. Sendo os pacientes imunocomprometidos os mais acometidos com esta forma clínica (DAWIT; GIRMA; SIMENEW, 2013; DESJEUX, 2004; RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

A LV apresenta manifestações clínicas que podem ser encontrados em outras enfermidades, a exemplo da doença de Chagas, Malária e Esquistossomose, fato que torna o diagnóstico clínico complexo. Os sinais e sintomas da LV são febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia (Figura 6) (ARENAS *et al.*, 2017).

As manifestações clínicas da LV são organizadas em três estágios: inicial, estado e final. O período inicial é considerado a fase aguda da doença, quando se iniciam os sintomas e geralmente inclui febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutaneomucosa e hepatoesplenomegalia em fase inicial. Entretanto, o estado geral do paciente está preservado, podendo apresentar tosse e diarreia, e ausência de respostas ao uso de antimicrobianos (BRASIL, 2014).

Figura 6 - Hepatoesplenomegalia característica da Leishmaniose Visceral em estágio terminal



Fonte: WHO (2020).

O período de estado é aquele em que os pacientes desenvolvem os sinais clássicos da leishmaniose visceral. Eles podem apresentar comprometimento do estado geral, que se caracteriza por presença de febre, anemia, hepatoesplenomegalia, manifestações hemorrágicas, taquicardia, perda de peso, linfadenomegalia, e, ocasionalmente, tosse seca e diarreia. Os sinais e sintomas de desnutrição se desenvolvem com a progressão da doença, incluindo edema periférico, queda de cabelos e alterações da pele e das unhas (ARENAS *et al.*, 2017).

A fase final acontece quando o paciente não foi diagnosticado e/ou não fez o tratamento para LV. Neste estágio, o paciente apresenta uma piora do estado geral, com comprometimento e agravamento do quadro. Além disso, ocorre febre contínua, com cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca, caracterizando um estado nutricional deprimido, com presença de edema nos membros inferiores podendo evoluir para anasarca e manifestações hemorrágicas, icterícia e ascite. Por fim, o paciente fica imunocomprometido e o óbito geralmente ocorre em decorrência de infecções bacterianas e/ou sangramentos (BRASIL, 2014).

## 2.5 Diagnóstico e tratamento das leishmanioses

O diagnóstico das leishmanioses envolve a compreensão dos aspectos epidemiológicos, das características clínicas e dos resultados laboratoriais. O diagnóstico clínico, para ser completo no âmbito da leishmaniose, não pode se ater apenas as características dos sintomas, deve considerar também os dados epidemiológicos da localidade para uma devida anamnese. Por conseguinte, na anamnese, a observação dos aspectos epidemiológicos e tipo de lesão são importantes para o diagnóstico laboratorial, pois esses dados podem guiar na interpretação dos resultados (DAWIT *et al.*, 2013).

O diagnóstico laboratorial é dividido em parasitológico, que é o padrão ouro, e imunológico, que envolve as técnicas baseadas na pesquisa dos anticorpos, e o molecular, baseado na PCR. No diagnóstico parasitológico entende-se por aquele que evidencia diretamente a presença do parasito no material biológico. Desta forma, pode-se realizar a pesquisa direta do parasito em lâmina por meio de escarificação ou aspiração de lesão com seringa e agulha fina e *imprint* de biópsia de lesão, ou no caso da LV, aspirado de linfonodo, baço ou medula. O material é fixado com metanol e pode ser corado por Giemsa ou pelo método Romanowsky, sendo observado em microscópio óptico. A positividade se dá pela visualização de formas amastigotas na lâmina (RÍOS; YUIL DE RÍOS, 2011; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

O cultivo da *Leishmania* spp. também é uma forma de diagnóstico parasitológico, onde o material obtido por biópsia/aspiração pode ser inoculado em meio de cultura bifásico como ágar sangue e meio líquido (meio NNN). Este método requer pessoal técnico bem treinado e o mesmo possui um período de incubação de aproximadamente 15 a 30 dias para confirmação do diagnóstico (BRASIL, 2017). Outros métodos parasitológicos são a inoculação em animais (BALB/c) ou o xenodiagnóstico (BRASIL, 2017; RÍOS; YUIL de RÍOS, 2011).

O diagnóstico imunológico é realizado por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Teste de Aglutinação Direta (DAT) e Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA), estando a Intradermorreação de Montenegro em desuso (DAWIT *et al.*, 2013).

A Intradermorreação de Montenegro consiste na aplicação de antígenos denominados *Leishmanina* por via subcutânea no paciente, e visualização de formação de pápula na área aplicada em 48 a 72h (ARENAS *et al.*, 2017).

A RIFI identifica a infecção no estágio inicial da doença, porém passa a ser indetectável em seis a nove meses após a cura clínica. Se após esse período, os anticorpos anti-leishmania permanecerem detectáveis, mesmo que em títulos baixos, pode ser um indicativo de futura recidiva. ELISA é uma técnica importante para detecção de anticorpos anti-leishmania, mas sua sensibilidade depende do antígeno utilizado, além de que oferece uma especificidade melhor para a detecção quando o indivíduo está acometido pela LV (SZARGIKI *et al.*, 2009).

Em comum, esses testes determinam os títulos de anticorpos anti-leishmania presentes no soro, entretanto a sensibilidade e a especificidade variam muito conforme o teste realizado. Quando os testes sorológicos são preparados com antígeno homólogo à espécie de *leishmania* circulante, esses parâmetros têm valores próximos a 100% (SZARGIKI *et al.*, 2009).

O diagnóstico molecular tem sido frequentemente utilizado, no entanto, nos países em desenvolvimento, as técnicas moleculares ainda são onerosas para um laboratório clínico. Dentre os procedimentos destacam-se: a PCR convencional, a análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), PCR em tempo real e polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), entre outros (ARENAS *et al.*, 2017; TALMI-FRANK *et al.*, 2010; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

O diagnóstico diferencial da LTA deve ser sempre levado em consideração, observando-se a forma clínica e as características da lesão (BRASIL, 2017). Na diferenciação do diagnóstico de LTA algumas doenças fúngicas podem ser confundidas com a lesão clássica da LTA como a paracoccidioidomicose, histoplasmose cutânea, esporotricose e cromoblastomicose, além de infecções por *Balamuthia mandrillaris*, que é uma ameba de vida livre, outras diferenciações podem ser feitas a partir de neoplasias, infecções bacterianas, úlceras varicosas e de lesões provenientes de acidentes (BRASIL, 2017).

O tratamento das leishmanioses, de acordo com a OMS (RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020), é realizado com dose recomendada de antimoniato de N-metilglucamina calculado em mg/Sb<sup>+5</sup>/Kg/dia. Os antimoniais interferem na oxidação de ácidos graxos e na glicólise das leishmanias, portanto uma droga leishmanicida.

Nas lesões cutâneas a dose recomendada é de 10 a 20mg/Sb<sup>+5</sup>/Kg/dia durante 20 dias seguidos, sem ultrapassar a quantidade de três ampolas por dia para adultos. Nas lesões mucosas a dose recomendada é de 20mg/Sb<sup>+5</sup>/Kg/dia durante 30 dias seguidos. Em pacientes com LV a dosagem recomendada é também de 20mg/Sb<sup>+5</sup>/Kg/dia por 20 a 40 dias (BRASIL, 2017; PAHO, 2019; ROMERO *et al.*, 2017; RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020).

Quando se administra por via endovenosa ou intramuscular, o antimonio de metilglucamina é rapidamente absorvido, sendo que até 90% desse fármaco é excretado nas primeiras 48 h pelos rins. Por isso, faz-se necessário o uso de doses elevadas, continuamente, para garantir uma taxa de antimonio nos tecidos, obtendo a eficácia do tratamento (ROMERO *et al.*, 2017). O tratamento em gestantes deve ser feito com drogas de segunda escolha, como a Anfotericina B, pois os antimoniais atravessam a barreira transplacentária e podem impregnar o tecido nervoso do feto, levando a síndromes severas de retardo mental (BRASIL, 2017; PAHO, 2019; ROMERO *et al.*, 2017; RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020).

A Anfotericina B e as pentamidinas são as drogas de segunda escolha para tratamento de leishmanioses dos casos que não tiveram efeito com os antimoniais ou em gestantes. A Anfotericina B também é leishmanicida, tendo ação nos ésteres da membrana plasmática das leishmanias. É formulada em suspensão coloidal e comercializada em frasco-ampolas com 50mg. Sua aplicação recomendada é de 1mg/kg/dia diariamente ou em dias alternados sem que ultrapasse a dose de 50mg por aplicação, deve também ser administrada até alcançar as doses totais do final do tratamento de 1,5 g para a forma cutânea e de 3,0 g para a forma mucosa. A Anfotericina B é contra-indicada em pacientes cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas (BRASIL, 2017; PAHO, 2019; ROMERO *et al.*, 2017; RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020).

As pentamidinas são diamidinas aromáticas, comercializadas para uso em humanos nas formulações de Isotionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) e Mesilato (Di-B-Hidroximetil-Sulfonato). Sua aplicação é de 4mg/kg/dia por via intramuscular profunda, sendo administrada de dois em dois dias, e recomenda-se que não ultrapasse a dose total diária de 2 g, pois agem no metabolismo da glicose, que pode induzir a uma hipoglicemia seguido de hiperglicemia. É contra-indicada em caso de gestação, diabetes mellitus, insuficiência renal, insuficiência hepática,

doenças cardíacas e em crianças com peso inferior a 8 kg (BRASIL, 2017; ROMERO *et al.*, 2017).

## 2.6 Epidemiologia das leishmanioses

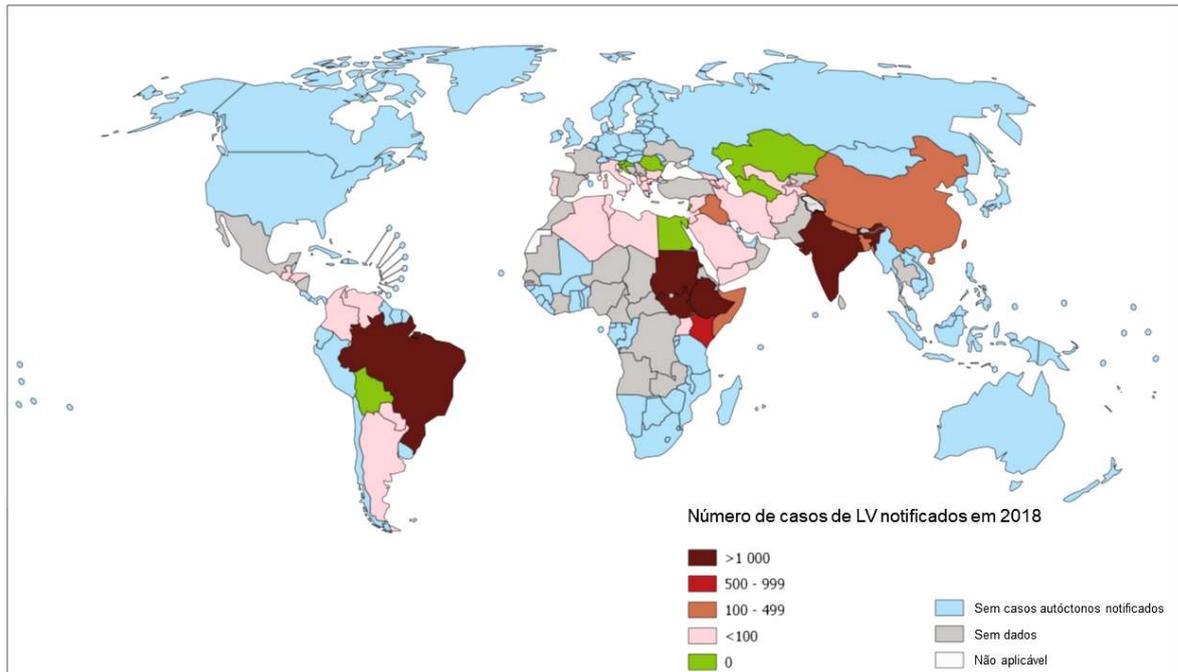
A leishmaniose continua sendo uma das doenças mais negligenciadas no mundo e afeta predominantemente os mais pobres, especialmente nos países em desenvolvimento; estima-se que haja 350 milhões de pessoas em risco de contraí-la e dois milhões de novos casos ocorram a cada ano (RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020).

Essa doença afeta principalmente a população de baixa renda de vários países na África, Ásia e na América Latina, sendo associada à desnutrição, migração, más condições de moradia, sistema imunológico deprimido e falta de recursos (PAHO, 2019).

É estimada a ocorrência de 50.000 a 90.000 novos casos de leishmaniose visceral todos os anos no mundo. Bangladesh, Índia e Nepal são países que tem conseguido grande avanço no controle e eliminação da LV. Apesar da Índia ainda pertencer ao grupo de países com maior concentração de casos de LV no mundo, juntamente com Brasil, Somália, Etiópia, Quênia, Sudão e Sudão do Sul, concentram 90% dos casos notificados (Figura 7) (RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020). O Brasil é responsável por aproximadamente 90% dos casos nas Américas (PAHO, 2019).

A LV é uma doença de notificação compulsória no Brasil por ser uma endemia grave (BRASIL, 2014). A doença foi confirmada em todas as regiões do Brasil. Somente nos anos de 2001 a 2017 foram confirmados 57.582 casos de LV, sendo 4.114 casos notificados somente em 2017, com uma incidência na população total do país de 1,98 casos/100 mil hab. (PAHO, 2019).

Figura 7 - Representação da leishmaniose visceral no mundo em 2018.



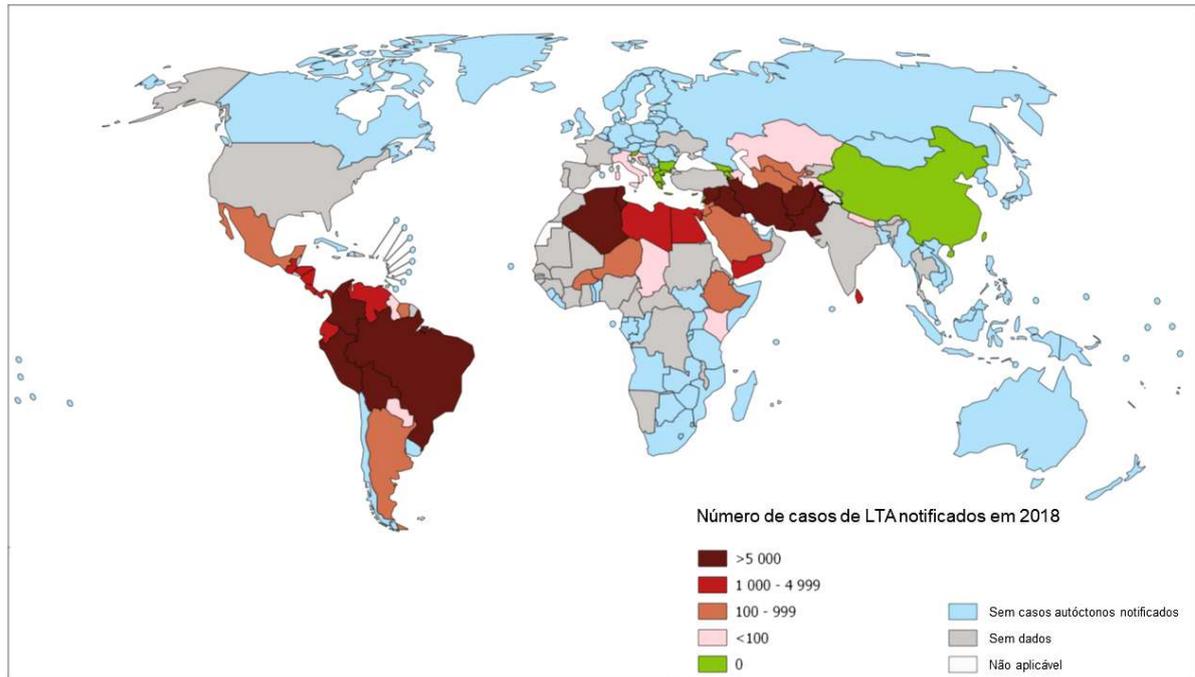
Fonte: WHO (2018a), com modificações.

A LTA é endêmica em 87 países de clima tropical e subtropical. Apresenta uma incidência de 1,2 milhões de casos, sendo 90% dos casos concentrados em nove países: Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (Figura 8) (GUPTA, P. S.; SONI; GUPTA, A., 2016; PAHO, 2019; RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020). Seu agente etiológico é um protozoário do gênero *Leishmania* spp., o qual é transmitida ao hospedeiro vertebrado por flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* spp. no velho mundo e *Lutzomyia* spp., *Nyssomyia* spp., *Brumptomyia* spp. e *Migonemyia* spp. no novo mundo (GALATI, 2014).

A LTA é uma das afecções dermatológicas com ampla área de endemidade que merece maior atenção, devido ao risco das lesões provocarem deformidades incapacitantes, com reflexo psicossocial e econômico (ARAUJO *et al.*, 2016; BRASIL, 2017).

O Brasil está entre os cinco países com maior número de casos de LTA nas Américas, com destaque para as regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017). Entre 1990 a 2011, o Ministério da Saúde notificou uma média anual de 26.725 novos casos de LTA com taxas de incidência nos estados brasileiros, variando entre 3.8 a 22.9 por 100.000 habitantes (BRASIL, 2017).

Figura 8 - Representação da leishmaniose cutânea no mundo em 2018.



Fonte: WHO (2018b), com modificações.

A LTA antes classificada como uma doença rural, nos últimos anos tem se expandido para áreas urbanas, estabelecendo um leque de três perfis epidemiológicos: silvestre, silvestre modificado e periurbano. Entende-se por perfil silvestre aquele onde ocorre a transmissão com focos naturais em ecossistemas florestais, enquanto que o perfil silvestre modificado ocorre por focos naturais com ciclos silvestres, mas em áreas de produção agrícola e perfil periurbano aquele que ocorre próximo a áreas habitadas (CURTI *et al.*, 2011; DETONI *et al.*, 2019; TALBI *et al.*, 2020).

Mesmo a LTA com caráter periurbano, ainda guarda características de doença rural que acomete majoritariamente pessoas do sexo masculino como profissões ligadas ao trabalho no campo (ARAUJO *et al.*, 2016; COELHO-NETO *et al.*, 2012; CURTI *et al.*, 2009). Segundo Araujo *et al.* (2016), destacam-se como fatores de risco para a LTA a falta de saneamento básico adequado nas residências, principalmente de áreas rurais; a criação de animais no domicílio e no peridomicílio e a habitação em locais próximos a matas, florestas e bosques. Dessa forma, é recomendado a utilização e adoção de ações baseadas nesses fatores de risco com objetivo de minimizar a endemia.

### 2.6.1 Geoprocessamento, série temporal e produção de mapa de risco das leishmanioses

O geoprocessamento envolve diversas disciplinas, como computação, estatística, geografia e cartografia para formar um conjunto de técnicas de coleta, tratamento, manipulação e apresentação de dados espaciais (ANDRADE; SANTANA; SACRAMENTO, 2014).

É um recurso utilizado na saúde pública para auxiliar na identificação de áreas de risco para agravos de saúde, pois é uma ferramenta tecnológica que auxilia a incorporação de dados espaciais na resolução de problemas concretos de saúde, permitindo entender os padrões epidemiológicos da doença (BEZERRA *et al.*, 2018; CAVALCANTE *et al.*, 2020). Segundo Barcellos e Bastos (1996), o geoprocessamento é definido como “um conjunto de técnicas de coleta, exibições e tratamentos de informações especializadas”, permitindo a análise conjunta de uma série de variáveis socioambientais.

Os Sistemas de Informações Geográficas (SIG) permitem ao geoprocessamento a identificação de áreas prioritárias que demandam ações de controle, além de ajudar a compreender os problemas de uma determinada região geográfica (CAVALCANTE *et al.*, 2020; GUEDES *et al.*, 2017).

Os SIG são tecnologias utilizadas para o processamento de informações provenientes de várias fontes, possibilitando a visualização socioambiental de determinados espaços geográficos, permitindo sua descrição e análise. Constitui-se, portanto, em instrumento válido para auxiliar a construção de mapas, evidenciando as desigualdades existentes em um dado território, e auxiliar no planejamento, monitoramento e avaliação das ações em saúde (ZAIDAN, 2017).

Pesquisas epidemiológicas são indispensáveis nos programas de controle das Leishmanioses, uma vez que permitem as análises de problemas por pessoa, tempo e espaço, permitindo aos pesquisadores modelar a ocorrência e determinar a extensão da doença (PAHO, 2019).

Segundo Antunes e Cardoso (2015), séries temporais são uma forma de organizar no tempo as informações quantitativas. No uso de séries temporais para determinado agravo, pode-se observar associação, sazonalidade, variação cíclica ou variação aleatória do dado quantitativo que se afere (ANTUNES; CARDOSO, 2015). Com a utilização das ferramentas de análise de séries temporais, como a regressão

linear, pode-se obter de forma primária a antevisão do comportamento de determinado agravo, bem como a análise do comportamento passado pode moldar as ações em saúde para acontecimentos semelhantes no futuro (ANTUNES; CARDOSO, 2015; ZAIDAN, 2017).

Para Assunção (1998), a análise da dispersão espacial do risco de uma doença é feita principalmente através de mapas de taxas de incidência ou alguma outra medida epidemiológica de risco. Estes mapas podem ter três objetivos principais para a sua produção: descritivo, exploratório e associação.

Em pesquisas, ao observar as relações no tempo, estas não se tornam evidentes da mesma maneira que na dimensão espacial, porque no espaço encontram-se outras instâncias da sociedade superpostas, como por exemplo, a econômica e cultural-ideológica, além dos fatores propriamente ambientais, que se manifestam em variáveis socioeconômicas quantificáveis, que podem atuar como fatores com possibilidade de interferir em estudos ecológicos (ZAIDAN, 2017).

Análises temporais e/ou espaciais sobre a leishmaniose e outras doenças já foram realizados em outros estados do nordeste do Brasil, como o Ceará (CAVALCANTE *et al.*, 2020) e Maranhão (FURTADO *et al.*, 2015). No entanto, apesar de o estado de Pernambuco, localizado na região nordeste do Brasil, ter parte de seus municípios endêmicos para ambas as formas de leishmanioses (ARAUJO *et al.*, 2016; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2017; PESSOA-E-SILVA *et al.*, 2019), na literatura, não existem estudos com esse tipo de análise.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Determinar e mapear os casos humanos de LTA no município de Timbaúba-PE e correlacionar a distribuição espacial de flebotomíneos no período de 2018 a 2019 e analisar espacialmente os casos humanos de LTA e LV no Estado de Pernambuco em uma série histórica de 2009 a 2018.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar os casos de LTA no município de Timbaúba-PE no período de 2018 a 2019.
- Avaliar a distribuição espacial dos casos de LTA no município de Timbaúba-PE no período de 2018 a 2019.
- Identificar as espécies de flebotomíneos capturadas no município de Timbaúba-PE, no período de 2018 a 2019.
- Determinar a taxa de infecção natural por *Leishmania braziliensis* de flebótomos capturados no município de Timbaúba-PE;
- Avaliar a distribuição espacial das espécies de flebotomíneos capturadas no município de Timbaúba-PE;
- Relacionar geograficamente a distribuição espacial de flebotomíneos com os casos de LTA no período do estudo;
- Descrever as características sociodemográficas e clínicas dos casos de LV e LTA no Estado de Pernambuco no período de 2009 a 2018;
- Identificar a tendência de distribuição de LV e LTA segundo municípios do Estado de Pernambuco no período de 2009 a 2018;
- Identificar agregados de municípios com maior incidência de LV e LTA do Estado de Pernambuco no período de 2009 a 2018;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desenho do estudo

Foram realizados dois estudos, o primeiro do tipo agregado, observacional, transversal, ecológico e descritivo das características dos indivíduos com LTA e dos flebotomíneos coletados e de sua dispersão em Timbaúba-PE e o segundo do tipo ecológico, retrospectivo e com base em análise espacial em Pernambuco.

### 4.2 Populações da pesquisa

Para o artigo de produção de mapa de risco da LTA em Timbaúba-PE, denominado nesta metodologia de Artigo 1, a população de análise foram os indivíduos suspeitos de terem LTA e os flebotomíneos coletados em campo no período de 2018 a 2019 no município de Timbaúba-PE.

Foram considerados indivíduos suspeitos de terem LTA todos aqueles que foram identificados clinicamente como tendo lesão ativa característica de leishmaniose. Para participarem deste estudo, os indivíduos suspeitos de ter LTA foram adultos acima de 18 anos de idade e residentes no município de Timbaúba-PE.

Para o Artigo 2, referente ao estudo de análise de série temporal de LV e LTA no período de 2009 a 2018 em Pernambuco, foram investigados todos os casos confirmados de Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana do Estado de Pernambuco notificados no período de 2009 a 2018.

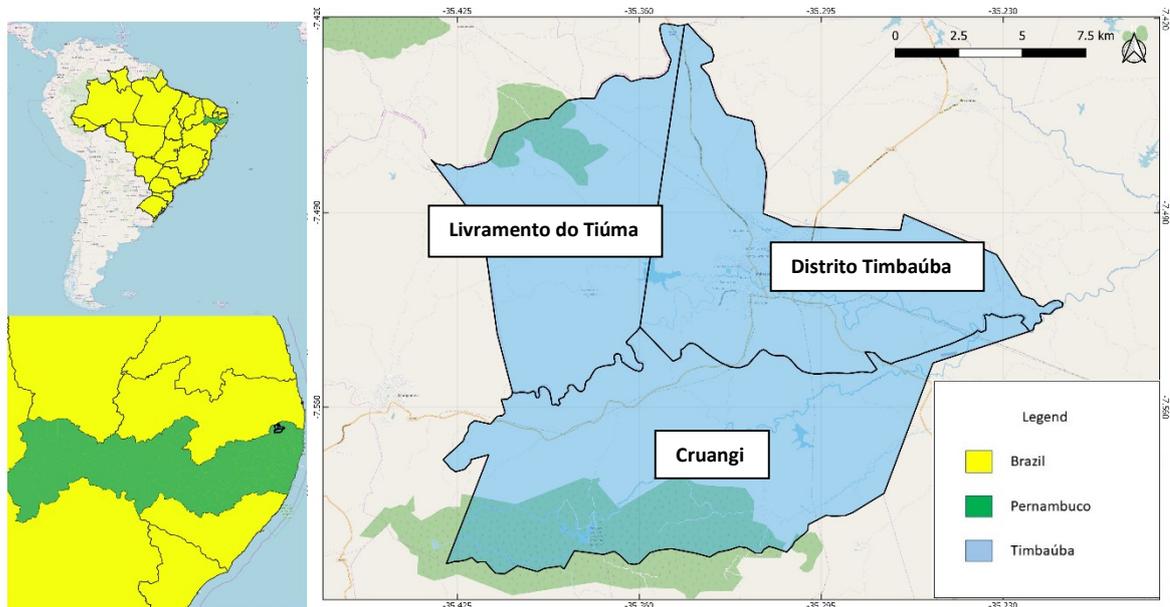
Foram excluídos os casos que não indicavam o local (município) de residência do paciente. Além disso, foram usadas as informações sociodemográficas do censo 2010, contidas no banco de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (IBGE, 2018). A pesquisa foi realizada com dados secundários, a partir do banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

### 4.3 Áreas de estudo

- Artigo 1

A área de estudo do artigo 1 foi o município de Timbaúba, que foi fundada em 1879, quando foi desmembrada do município de Itambé. Situada na mesorregião Mata e na Microrregião Mata Setentrional do Estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil, a uma latitude 07°30'19" Sul e a uma longitude 35°19'06" Oeste, estando a uma altitude de 102 metros (Figura 9). Sua população estimada em 2017 pelo IBGE é de 53.083 habitantes e possui uma área territorial de 298,51 km<sup>2</sup> (IBGE, 2018; TIMBAUBA, 2018).

Figura 9 - Mapa do Município de Timbaúba – Pernambuco, Brasil

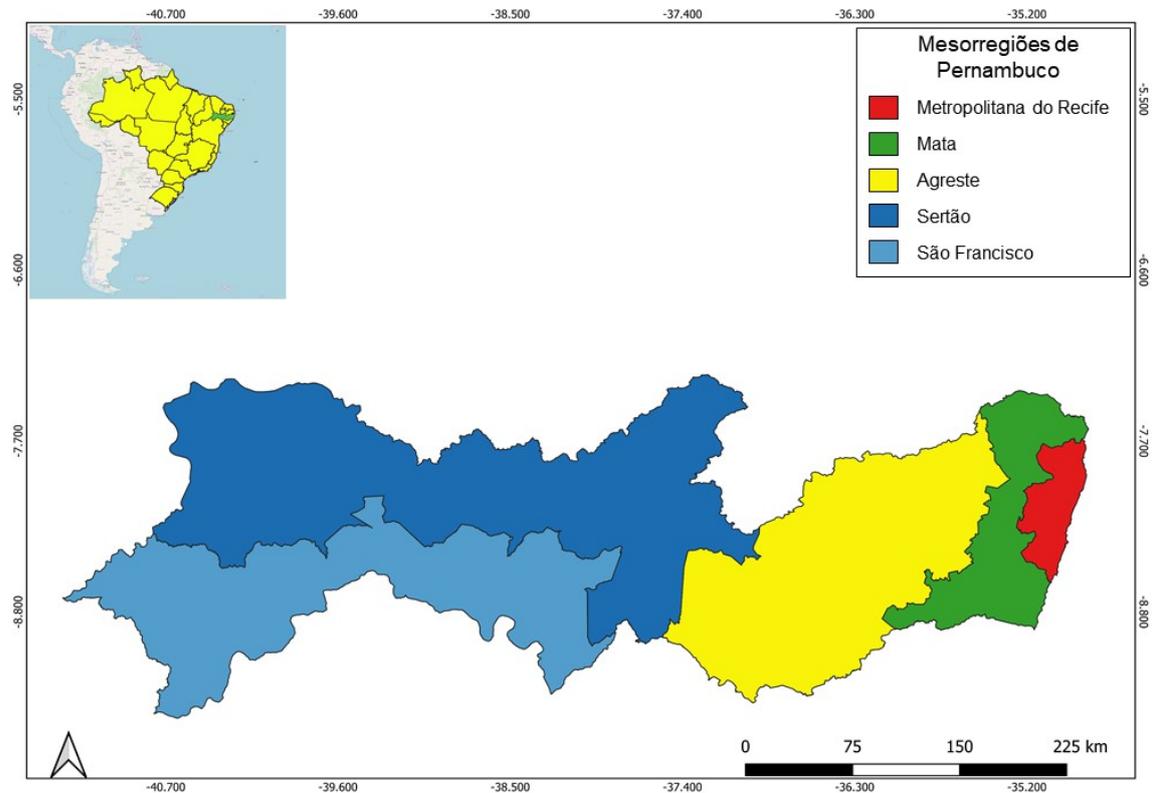


Fonte: Mapa – produção própria; Dados – IBGE (2018).

- Artigo 2

Para o artigo 2, a área de estudo foi o Estado de Pernambuco (Figura 10), que está localizado na região Nordeste do Brasil, tem como capital a cidade de Recife e possui um território de 98.076,109 Km<sup>2</sup>, está limitado ao norte com os estados da Paraíba e Ceará, ao sul com os estados de Alagoas e Bahia, ao oeste com o estado do Piauí, além de ser banhado pelo oceano Atlântico e possui uma população estimada de 9.557.071 de habitantes (IBGE, 2018).

Figura 10 - Mapa do Estado de Pernambuco e suas mesorregiões



Fonte: Mapa – produção própria; Dados – IBGE (2018).

#### 4.4 Variáveis e obtenção de amostras

##### 4.4.1 Variáveis da série temporal

Foram analisados dois bancos de dados compostos por 1.224 casos de LV, e 3.675 casos de LTA, e estudadas 05 variáveis extraídas dos mesmos. Foram utilizadas as variáveis: sexo; idade; escolaridade; forma clínica (LTA); coinfeção com HIV (LV) e desfecho.

##### 4.4.1.1 Categorização das variáveis

- a) Sexo: categorizada como masculino ou feminino.
- b) Idade: anos completos de vida, agrupados nas seguintes categorias: de zero a 14 anos de idade; de 15 a 19 anos de idade; de 20 a 59 anos de idade e de 60 anos de idade em diante.

- c) Escolaridade: definido como último grau de ensino frequentado ou concluído. Categorizado como: analfabeto, que não frequentou escola; Ensino fundamental, que frequentou até este grau de ensino ou equivalente; Ensino Médio, que frequentou até este grau de ensino ou equivalente; Ensino superior, que frequentou até este grau de ensino ou equivalente.
- d) Forma clínica (LTA): definida como o tipo de manifestação clínica da LTA no indivíduo, se cutânea ou se mucosa.
- e) Coinfecção com HIV (LV): definido como coinfecção de HIV em indivíduos com LV. Categorizado como Sim: para aqueles que tem a coinfecção; Não: para aqueles que não tem a coinfecção; Ignorados: para aqueles em que esta informação não foi obtida.
- f) Desfecho: Evolução da LTA ou da LV no indivíduo acometido. Categorizado como Cura: a doença evoluiu para a cura; Abandono: o paciente abandonou o tratamento e não há a informação da evolução da doença; Óbito/leishmaniose: óbito devido a complicações da leishmaniose; Óbito/outras: óbito devido a outras doenças não relacionadas com a leishmaniose.

#### *4.4.1.2 Cálculo da incidência e análise da correlação espacial*

A incidência de casos foi calculada dividindo o número de novos casos pela população de todo o estado e multiplicando por 100.000. O coeficiente de letalidade para LV foi obtido dividindo o número de óbitos pelo total de casos confirmados e multiplicando por 100.

A correlação espacial foi calculada através do índice de Moran global, que permite identificar se há dependência espacial entre os dados. O resultado do Moran global é definido no intervalo de -1 a +1 com nível de significância de 5%, onde haverá correlação espacial quando os resultados forem diferentes de 0.

#### *4.4.2 Coleta de amostras sanguíneas e diagnóstico sorológico para LTA*

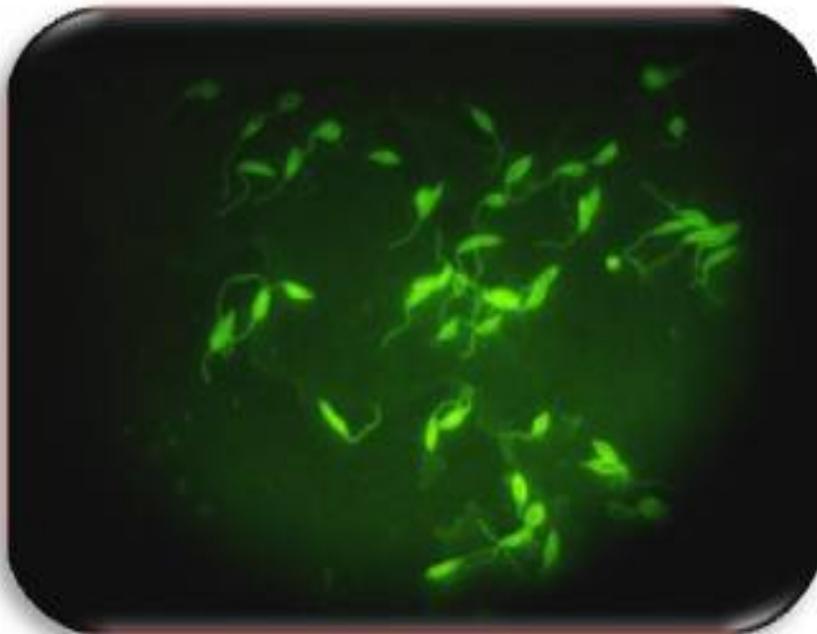
Os indivíduos suspeitos de terem LTA foram identificados por agentes de saúde do Município de Timbaúba-PE, sendo encaminhados para o posto de saúde mais próximo dos seus locais de residência e avaliados por médicos do Programa de Saúde da Família. Confirmada a suspeita clínica, os indivíduos foram orientados

e solicitados a participarem deste estudo. Após a assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) foi coletado o sangue do paciente.

Os indivíduos encaminhados para diagnóstico sorológico de LTA seguiram para a coleta de amostra de sangue. Foi realizada a coleta de 4 mL de sangue dos indivíduos no laboratório municipal de Timbaúba - PE em um tubo com vácuo e sem anticoagulante. Em seguida, os tubos foram encaminhados aos Laboratórios de Leishmanioses e de Biologia Celular e Molecular ambos do Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ/PE).

As amostras de sangue coletadas foram processadas para o diagnóstico sorológico de LTA. As amostras foram centrifugadas à 2.500 RPM por 10 min para a obtenção do soro, que foi armazenados à -20 °C. Os soros dos indivíduos foram submetidos à RIFI utilizando-se o kit IFI – Leishmaniose Humana BioManguinhos®. Considerados reagente para LTA os títulos de RIFI a partir de 1/40. Os indivíduos diagnosticados clínica e sorologicamente com LTA, foram encaminhados para tratamento nos serviços de saúde do Município de Timbaúba/PE.

Figura 11 - Foto de pool de *Leishmania braziliensis* em lâmina submetida a soro de controle positivo para leishmaniose tegumentar pela técnica de RIFI. Aumento de 400x.



Fonte: Acervo pessoal.

#### 4.4.3 Captura e manejo de flebotomíneos

O estudo foi realizado com flebotomíneos silvestres coletados por nosso grupo no Município de Timbaúba-PE. Foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CDC (Center for Disease Control light trap) (Figura 12), que foram instaladas no peridomicílio em residências com casos ativos ou relatados de leishmaniose tegumentar americana (Figura 13).

As armadilhas foram colocadas sempre as 17h e foram retiradas após 12 horas. Neste momento, foram retirados os flebotomíneos das armadilhas com o auxílio de capturadores manuais de Castro e postos em gaiolas onde foram oferecidos algodões embebidos com solução de sacarose a 70% para a alimentação dos insetos durante o deslocamento.

O transporte dos flebotomíneos deu-se em gaiolas dentro de caixas de isopor, tendo controlados a temperatura e a umidade. No laboratório as fêmeas de flebotomíneos foram inativadas em baixa temperatura e separadas em *pools* de 10 fêmeas para identificação de espécie e posterior processamento.

Figura 12 - Modelo de armadilha luminosa do tipo CDC utilizada para capturas de flebotomíneos no município de Timbaúba-PE.



Fonte: acervo pessoal.

Figura 13 - Instalação e remoção de armadilhas do tipo CDC com captura de flebotomíneos.



Fonte: Acervo pessoal.

#### 4.4.3.1 Preparação, Montagem e Identificação dos flebotomíneos

A preparação e montagem dos flebotomíneos foi realizada utilizando-se bálsamo do Canadá para os machos e líquido de Berlese para as fêmeas (LANGERON 1949, modificada). A utilização do bálsamo para montagem dos machos se justifica pela durabilidade da preparação, enquanto o líquido de Berlese para fêmeas possibilita o exame das estruturas internas com maior nitidez, devido a sua menor refração.

Foi utilizada como caráter taxonômico na identificação específica das fêmeas, a visualização das espermatecas e do cibário, mantendo no momento da dissecação a parte ventral da cabeça voltada para cima. Para os machos foram utilizadas as características do terço final do abdômen, como sua genitália. Em ambos as características das cabeças também foram observadas. A identificação específica dos flebotomíneos seguiu com a observação por microscopia ótica de caracteres morfológicos internos e externos, seguindo as chaves e a classificação proposta por Galati (2014).

## 4.5 Detecção da infecção natural de flebotomíneos por *L. braziliensis*

### 4.5.1 Extração de DNA das fêmeas capturadas

As fêmeas foram dispostas em *pools* contendo no máximo dez espécimes da mesma localidade e data de coleta. Então foram colocadas em tubos contendo RNA *Later* e armazenadas a -20 °C, para a realização da extração de DNA e posterior PCR para pesquisa de DNA de *L. braziliensis*

A extração de DNA dos *pools* de flebotomíneos seguiu o protocolo de Casaril *et al.* (2017), sendo assim, fêmeas de flebotomos foram maceradas em dodecil sulfato de sódio a 20% (SDS) e 200 µL de Tris-EDTA (TE).

Em seguida, foram acrescentados cinco microlitros (5 µL) de proteinase K (20 mg/mL) e o conteúdo homogeneizado por vórtex durante 1 min. Seguiu-se a incubação em banho seco a 42 °C por 24 h. Posteriormente 200 µL de fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico (25:24:1) foram adicionados às amostras, em seguida centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 min e a fase aquosa contendo o DNA foi coletada e colocada em outro tubo. Vinte microlitros (20 µL) de acetato de sódio 3M e 400 µL de etanol (100%) gelado foram adicionados e os tubos foram incubados overnight a -20 °C.

As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 12.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet lavado com 500 µL de etanol a 70%. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas durante 10 min a 12.000 rpm, e a 4°C, o sobrenadante descartado e após a evaporação do etanol restante à temperatura ambiente, as amostras foram ressuspensas em 50 µL de TE (1x) e armazenadas a -20 °C.

Após a extração foi realizada a dosagem de moléculas de DNA nas amostras extraídas, verificando a presença, concentração e qualidade do material extraído. Para este procedimento foi utilizado o espectrofotômetro de microvolume Nanodrop®-1000.

#### 4.5.2 Real time PCR para detectar a infecção natural de flebotomíneos por *L. braziliensis*.

Para a identificação da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* utilizou-se o material molecular obtido das fêmeas de flebótomo por Real Time PCR. A amplificação de DNA extraída do pool de fêmeas de flebotomos foi realizado a partir de um fragmento de 138pb de minicírculos de kinetoplastos (kDNA) (PAIVA CAVALCANTI *et al.*, 2013) que tem como alvo o subgênero Viannia, onde o kDNAf caracteriza-se por 22 pares de base com razão CG de 63.6% (ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC), enquanto que o kDNAr1 caracteriza-se por 21 pares de base com razão CG de 61.9% (GGGAGCGCGGCCCACTATATT) (acesso Genbank: U19807.1). As reações foram realizadas em duplicata, contendo 25 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems®), 1 µL de cada primer na concentração de 5 pmol/µL, além de 21 µL de H2O Milliq e 2 µL do DNA da amostra em um volume final de 50 µL.

As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador (Techne Thermal cycler TC - 412), com desnaturação inicial a 95°C por 5 min, sendo seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 s para desnaturação, 60°C por 1min para anelamento, 72°C por 30 s para extensão mais 72°C por 5 min para extensão final.

#### 4.6 Dados para geoprocessamento

As coordenadas geográficas foram obtidas através do navegador portátil GPS Garmin® eTrex Venture HC durante as instalações das armadilhas para captura dos flebotomíneos e nas residências de indivíduos positivos para LTA. Os dados obtidos foram transferidos para o software Microsoft Excel 2016® para criação de banco de dados. O software livre QGIS 3.10 (QGIS Development Team, 2020) foi empregado para as análises geoespaciais.

Os dados cartográficos e ambientais foram obtidos das bases de dados do IBGE. O sistema de referência geodésica SIRGAS 2000 (Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas) foi o sistema de coordenadas utilizado para representar características terrestres geométricas ou físicas. O SIRGAS é um sistema de referência geodésico que permite o desenvolvimento de atividades

práticas e científicas que necessitem de determinação precisa de coordenadas, de navegação e de investigação em geociências.

A área de vegetação nas proximidades dos casos de LTA e das capturas de flebótomos foram identificados por satélite Landsat 8, sensor OLI, em 27 de agosto de 2018 (fonte: [earthexplorer.usgs.gov/](http://earthexplorer.usgs.gov/)), usando vegetação de diferença normalizada variando entre -1 (menor quantidade de vegetação) e +1 (maior quantidade de vegetação).

#### 4.7 Análises estatísticas

Para o artigo 1: Foi utilizado o estimador não paramétrico (que não depende de parâmetros populacionais) de densidade de Kernel, que não tem valor estatístico, no entanto, permite estimar o número de eventos por unidade de área compreendendo a região do estudo. Foi aplicado para fins de descrição da amostra de indivíduos diagnosticados com LTA, onde foi definido uma largura de banda de 500 metros, a fim de avaliar o mapa de calor nas áreas de estudo. Para a comparação das frequências obtidas com a captura e identificação dos flebotomíneos foi utilizado o teste de Qui-quadrado, que permite fazer a comparação da distribuição de eventos, avaliando se as proporções observadas destes eventos mostram ou não diferenças significativas ao nível de 5%.

Para o artigo 2: Os dados coletados foram tratados no software *Microsoft Excel*<sup>®</sup>, para o tratamento estatístico foi utilizado o software *BioEstat*<sup>®</sup> 5.0. O software *TerraView 4.2.2*<sup>®</sup> foi utilizado para a obtenção dos indicadores locais de autocorrelação espacial, os mapas de espalhamento de Moran, além do cálculo do índice global de Moran.

#### 4.8 Aspectos éticos

Artigo 1: O estudo está licenciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz (CEP/IAM/FIOCRUZ) sob o número CAAE 59093316.0.000.5190 (ANEXO C) e de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki, 1964, e revisado em 1975, 1983, 1989, 1996, e 2000. Todos os indivíduos participantes da pesquisa foram esclarecidos quanto ao procedimento

realizado e uso dos dados para pesquisa, havendo concordância, eles leram e assinaram termo de consentimento.

Artigo 2: Este estudo se enquadra na resolução nº 510 de 07 de Abril de 2016 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil por se tratar de uma pesquisa com fonte oriunda de banco de dados onde suas informações são agregadas sem a possibilidade de identificação de indivíduos, justificando a ausência do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em humanos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MAPA DE RISCO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM UMA ÁREA RURAL: CASOS HUMANOS E ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS NO NORDESTE DO BRASIL.

#### Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), doença negligenciada de acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO) (PAHO, 2019), é endêmica em 87 países apresentando uma incidência de 1,2 milhões de novos casos por ano (GUPTA, P. S.; SONI; GUPTA, A., 2016; PAHO, 2019). No Brasil, em 2017 a incidência da LTA foi de 17,7 casos/100.000 hab (PAHO, 2019), segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2019) a região norte do país contribui com 37% do total de casos tendo os coeficientes mais elevados (73,3 casos/100.000 hab.), enquanto o nordeste do Brasil aparece com incidência de 18,8 casos/100.000 hab.

Nas regiões Norte e Centro-Oeste, áreas com intensiva atividade agrícola bem como áreas de intenso desmatamento coincidem com os locais de maiores números de casos (BRILHANTE et al., 2017; ZEILHOFER et al., 2008). Na região Nordeste outros fatores também estão relacionados com a alta incidência da LTA, como a agricultura familiar e a criação de animais nas proximidades das residências (ARAUJO et al., 2016; PEDROSA; XIMENES, 2009). Pernambuco, situado na região Nordeste do Brasil, tem 34% de seus municípios endêmicos para a ATL, entre estes está o município de Timbaúba (BRASIL, 2017), onde Araujo et al (2016), mostraram que a presença de animais domésticos no peridomicílio e a atividade econômica eram fatores de risco para a transmissão da leishmaniose tegumentar em Timbaúba.

A LTA é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, em Pernambuco a espécie causadora é a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, G., 2010), no entanto outras espécies também já foram descritas no Estado, como *Leishmania (L.) amazonenses*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi* (MORAIS et al., 2016).

Os vetores da LTA nas Américas são os flebotomos pertencentes a tribo Phlebotomini, que inclui espécies dos gêneros *Lutzomyia* spp., *Nyssomyia* spp., *Brumptomyia* spp. e *Migonemyia* spp. (SALES et al., 2019). Sendo os flebotomíneos

desses gêneros implicados com a transmissão da *Leishmania braziliensis* em diferentes regiões do Brasil. Em Pernambuco, a *Nyssomyia whitmani* é implicada como o principal vetor da LTA (BRANDÃO-FILHO et al., 2011) sendo considerada uma espécie adaptada ao peridomicílio e áreas de remanescentes de floresta (BRANDÃO-FILHO et al., 2011). Outro flebotomíneo também foi implicado como vetor da leishmaniose tegumentar em Pernambuco, porém em área de floresta densa, caso da *Lutzomyia choti* (DANTAS-TORRES et al., 2017). O vetor da leishmaniose visceral, a *Lutzomyia longipalpis*, também é encontrada no Estado (SILVA et al., 2014), assim como a *Migonemyia migonei* (CARVALHO et al., 2010; SILVA et al., 2014), que é implicada como vetor da *L. braziliensis* (RANGEL; LAINSON, 2009) e tem sido apontada como possível vetor da *L. infantum* (CARVALHO et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016).

Outro parâmetro que auxilia no esclarecimento da dinâmica da LTA em uma região é a determinação da taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp., auxiliando assim, no mapeamento das áreas de maior risco de transmissão. Todavia, para essa determinação a utilização de técnicas de PCR supera a utilização da dissecação de flebotomíneos pois tem maiores sensibilidade e especificidade, por identificar apenas uma célula amastigota de *Leishmania* em amostras testes (CASARIL et al., 2017). A taxa de infecção natural de flebotomíneos também pode ser usada como indicativo da implicação de alguma espécie de flebotomo na transmissão (DANTAS-TORRES et al., 2017). Esta detecção conjuntamente com a distribuição espacial e identificação das espécies envolvidas é de suma importância para a busca do controle nas áreas endêmicas (DANTAS-TORRES et al., 2017; DETONI et al., 2019; SOARES; GARCEZ; NETO, 2010).

Segundo Pirajá e Lucheis (2014), medidas como a identificação das possíveis espécies de flebotomíneos de importância médico-sanitária e o monitoramento das alterações de comportamento das principais espécies de flebotomíneos, em relação aos seus ecótopos naturais, são de grande importância, e certamente contribuirão para o controle das leishmanioses. Desta forma, objetivou-se utilizar a análise espacial para o mapeamento dos casos humanos de LTA e correlacionar com estudos ecológicos dos vetores em uma área endêmica rural no Estado de Pernambuco.

## **Métodos**

### **Área de estudo**

Timbaúba está situada na área de Mata Atlântica no norte de Pernambuco e distante 98 km da capital Recife. Sua população estimada em 2020 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) é de 50.956 habitantes e possui uma área territorial de 298,51 km<sup>2</sup> <sup>21</sup>.

O município está inserido na mesorregião Mata e na Microrregião Mata Setentrional do Estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil, com latitude 07°30'19" Sul e longitude 35°19'06" Oeste, composto pelos distritos de Livramento do Tiúma, Timbaúba e Cruangi. O distrito de Timbaúba é a área de maior povoamento do município, considerada a zona urbanizada. O distrito de Tiúma é a segunda área mais povoada do município e ainda é composto por grandes áreas de criação de bovinos. O último distrito, o de Cruangi, é a área mais rural do município e aqui estão as áreas de agricultura familiar, sobretudo com o cultivo de banana, e os engenhos com o cultivo de cana-de-açúcar, principal atividade econômica do município e circunvizinhanças.

### **Busca ativa de casos humanos**

O estudo foi realizado no período de janeiro/2018 a dezembro/2019. Os indivíduos suspeitos de terem LTA foram recrutados para este estudo por meio da demanda espontânea do sistema de saúde do Município, com auxílio dos agentes comunitários de saúde dos Posto de Saúde da família da localidade. Como critério para o recrutamento dos pacientes utilizou-se a presença de lesões sugestivas de LTA. Após a avaliação clínica, os indivíduos suspeitos de terem LTA, eram encaminhados para coleta de amostra de sangue que serviria para o diagnóstico sorológico. A confirmação laboratorial foi obtida usando a técnica de imunofluorescência (IFI) (Biomanguinhos® kit de leishmanioses humanas), onde títulos a partir de 1:40 eram considerados positivos, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil. Caso recusassem a participação no estudo, os pacientes teriam o seu diagnóstico, acompanhamento e tratamento garantidos.

### **Coleta e identificação de flebotomíneos**

Flebotomíneos foram coletados em ambientes intra e peridomicílio de residências com casos ativos ou relatados de LTA no distrito de Cruangi, Timbaúba, no período de janeiro/2018 a dezembro/2019 mensalmente, utilizando-se armadilhas do tipo CDC. As armadilhas foram colocadas sempre as 17h e retiradas após 12h. Neste momento, foram retirados os insetos flebotomíneos das armadilhas com o auxílio de capturadores manuais de Castro e transferidos para gaiolas devidamente identificadas, onde foram oferecidos algodões embebidos com uma solução a 70% de sacarose para alimentação dos insetos, e em seguida transportados para serem analisados no Laboratório de Mutagenese e Leishmaniose/Departamento de Parasitologia/FIOCRUZ.

Após serem anestesiados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, os flebotomíneos foram separados para identificação de espécie e posterior processamento para extração de DNA. A preparação e montagem dos flebotomíneos em lâmina foi realizada utilizando-se bálsamo do Canadá para os machos e líquido de Berlese para as fêmeas. A identificação específica dos flebotomíneos seguiu com a observação por microscopia ótica de caracteres morfológicos internos e externos, seguindo as chaves e a classificação proposta por Galati (2014). As fêmeas dos flebotomíneos, de todas as espécies identificadas, foram separadas para posterior investigação molecular quanto a infecção por leishmania.

### **Detecção da infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania (Viannia) braziliensis***

As fêmeas foram dispostas em *pools* contendo 10 (dez) espécimes da mesma espécie, da mesma localidade e data de coleta. Não sendo utilizadas para esta etapa fêmeas com ingurgitação recente. Foram colocadas em tubos contendo RNA *Later* e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A extração do DNA dos *pools* de flebotomíneos seguiu o protocolo de Casaril *et al.* (2017), sendo assim, as fêmeas de flebotomos foram maceradas com dodecil sulfato de sódio a 20% (SDS) e 200  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA (TE), em seguida, foram acrescentados 5  $\mu\text{L}$  de proteinase K (20 mg/mL) e incubados em banho seco a  $42^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Posteriormente, foram adicionados fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1), acetato de sódio 3M e etanol. As amostras foram ressuspensas em 50  $\mu\text{L}$  de TE (1x) e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após a

extração foram avaliados a concentração e qualidade do material extraído com o espectrofotômetro de microvolume Nanodrop®-1000.

Para a identificação da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* utilizou-se o material molecular obtido das fêmeas de flebótomo por Real Time PCR. A amplificação de DNA extraída do pool de fêmeas de flebótomos foi realizado a partir de um fragmento de 138pb de minicírculos de kinetoplastos (kDNA) (PAIVA CAVALCANTI *et al.*, 2013) que tem como alvo o subgênero Viannia, onde o kDNAf caracteriza-se por 22 pares de base com razão CG de 63.6% (ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC), enquanto que o kDNAr1 caracteriza-se por 21 pares de base com razão CG de 61.9% (GGGAGCGCGGCCCACTATATT) (acesso Genbank: U19807.1). As reações foram realizadas em duplicata, contendo 25 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems®), 1 µL de cada primer na concentração de 5 pmol/µL, além de 21 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ e 2 µL do DNA da amostra em um volume final de 50 µL.

As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador (Techne Thermal cycler TC - 412), com desnaturação inicial a 95°C por 5 min, sendo seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 s para desnaturação, 60°C por 1min para anelamento, 72°C por 30 s para extensão mais 72°C por 5 min para extensão final.

### **Geoprocessamento**

As coordenadas geográficas foram obtidas através do navegador portátil GPS Garmin® eTrex Venture HC durante as instalações das armadilhas para captura dos flebotomíneos e nas residências de indivíduos positivos para LTA. Os dados obtidos foram transferidos para o software Microsoft Excel 2016® para criação de banco de dados. O software livre QGIS 3.10 (QGIS Development Team, 2020) foi empregado para as análises geoespaciais.

Os dados cartográficos e ambientais foram obtidos das bases de dados do IBGE. O sistema de referência geodésica SIRGAS 2000 (Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas) foi o sistema de coordenadas utilizado para representar características terrestres geométricas ou físicas.

A área de vegetação nas proximidades dos casos de LTA e das capturas de flebótomos foram identificados por satélite Landsat 8, sensor OLI, em 27 de agosto de 2018 (fonte: [earthexplorer.usgs.gov/](http://earthexplorer.usgs.gov/)), usando vegetação de diferença

normalizada variando entre -1 (menor quantidade de vegetação) e +1 (maior quantidade de vegetação).

### **Análise estatística**

O estimador não paramétrico (que não depende de parâmetros populacionais) de densidade de Kernel não tem valor estatístico, no entanto, permite estimar o número de eventos por unidade de área compreendendo a região do estudo. Foi aplicado para fins de descrição da amostra de indivíduos diagnosticados com LTA, onde foi definido uma largura de banda de 500 metros, a fim de avaliar o mapa de calor nas áreas de estudo. Para a comparação das frequências obtidas com a captura e identificação dos flebotomíneos foi utilizado o teste de Qui-quadrado, que permite fazer a comparação da distribuição de eventos, avaliando se as proporções observadas destes eventos mostram ou não diferenças significativas ao nível de 5%.

### **Aspectos Éticos**

O estudo está licenciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz (CEP/IAM/FIOCRUZ) sob o número CAAE 59093316.0.000.5190 and in accordance with the principles of Declaration of Helsinki, 1964, as revised in 1975, 1983, 1989, 1996, and 2000. Todos os indivíduos participantes da pesquisa foram esclarecidos quanto ao procedimento realizado e uso dos dados para pesquisa, havendo concordância, eles leram e assinaram termo de consentimento.

### **Resultados**

Durante o período deste estudo, foram identificados 60 casos de LTA em uma população de 92 suspeitos. Dos casos, 33 (55%) eram do sexo masculino e 27 (45%) do sexo feminino. A taxa de incidência em cada ano do estudo foi de 56,9 e 60,8 casos por 100 mil habitantes. A maior parte dos acometidos pela LTA (53%) eram da faixa etária economicamente ativa, ou seja, dos 18 aos 59 anos de idade. Foram encontrados casos de LTA em dois dos três distritos do município de Timbaúba. No distrito de Cruangi (área rural) se concentraram a maior parte dos casos (97%), enquanto o distrito urbano de Timbaúba teve apenas 3% dos casos e o distrito de Tiúma não teve casos confirmados de LTA. As coordenadas geográficas das residências (92 pontos geográficos) de todos os considerados suspeitos para

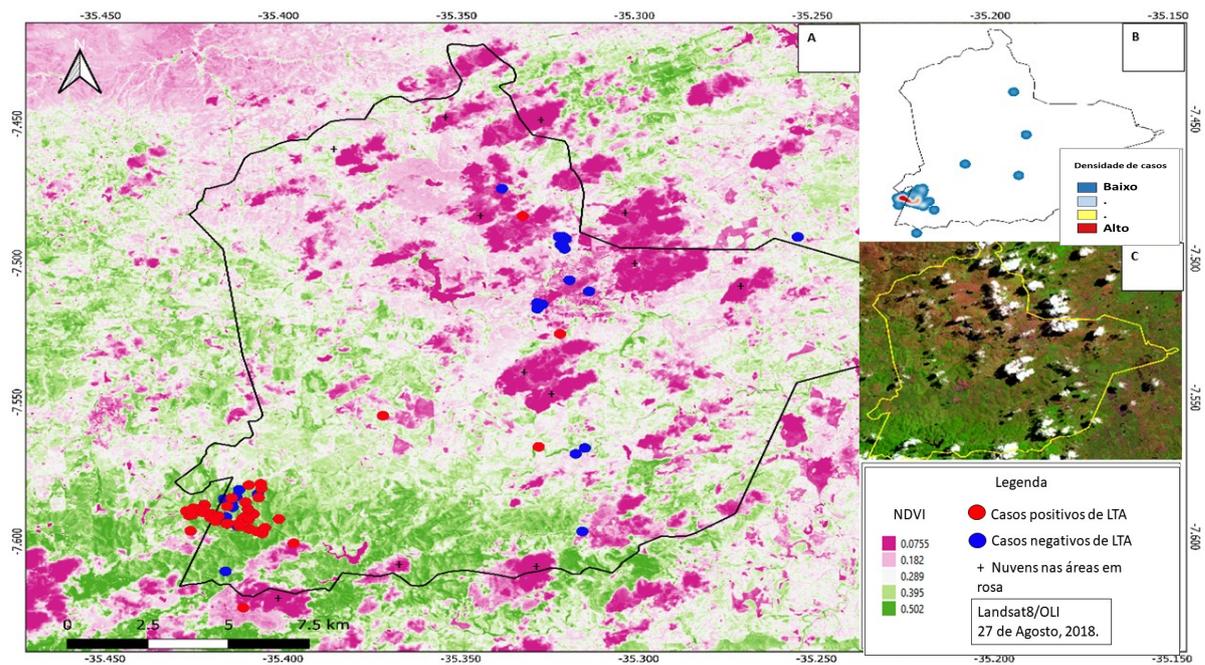
LTA foram obtidas através do navegador portátil GPS, sendo utilizados nas análises geoespaciais.

No mapeamento dos pontos da distribuição espacial dos casos confirmados de LTA e dos negativados (figura 1A), estão registrados a distribuição de todos os suspeitos para a LTA no período de estudo. Neste mapa, observa-se a concentração de casos de LTA no distrito de Cruangi em uma área de divisa com a Mata Atlântica e áreas de grande vegetação, de acordo com o normalized difference vegetation index (NDVI), que mostra a concentração de vegetação em um território baseado em imagens de satélite (Landsat8/OLI, em 27 de Agosto, 2018. fonte: earthexplorer.usgs.gov/). O NDVI varia de -1 para áreas sem vegetação a +1 para áreas de densa vegetação.

O mapa de densidade Kernel (figura 1B), mostra os hotspots de casos de LTA. Nesses pontos as áreas mais “quentes”, identificados em coloração vermelha no mapa, são as consideradas como de maior chance de transmissão da LTA no Município de Timbaúba. Nesta figura, os hotspots para a LTA estão na região cercada por vegetação densa (NDVI) que coincide com as áreas de fragmentos de Mata Atlântica.

Na mesma área de concentração dos casos de LTA, foram capturados e identificados 3.744 espécimes de flebótomos em 27 locais de captura (tabela 1), todos localizados no distrito de Cruangi, Timbaúba. Dos flebótomos coletados houve a predominância de machos (2.269; 60,6%) em relação as fêmeas (1.475; 39,4%), tendo uma razão (M:F) de 1,54:1,00 ( $p < 0,05$ ). Dos espécimes capturados, foram identificadas cinco espécies de flebotomíneos coabitando esta área: *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Evandromyia evandroi*, *Psychodopygus wellcomei* e *Micropygomyia quinquefer*.

Figura 1 – Distribuição espacial dos casos confirmados de LTA (pontos vermelhos) e dos suspeitos negativados para LTA (pontos azuis) no município de Timbaúba, Pernambuco. A - Mapa com (NDVI) onde os tons rosa correspondem às áreas com menor índice de vegetação (-1) e os tons verdes às áreas com maior índice de vegetação (+1); B – Mapa de calor (Kernel) dos casos de LTA no período de 2018 a 2019; C – Extensão do município de Timbaúba em falsa-cor RGB432.



A espécie mais frequente nas capturas foi a *Ny. whitmani* ( $p < 0,05$ ) com 3.167 flebotomos identificados sendo 1.825 machos e 1.342 fêmeas e presente em todos os pontos de coleta. A segunda espécie em frequência nas coletas foi a *Mg. migonei*, também presente em todos os pontos de coleta (Tabela 2).

Após a identificação da espécie, as fêmeas dos flebotomíneos, em um total de 1.475 fêmeas, foram separadas em pools de até 10 fêmeas cada e analisadas quanto a presença de *Leishmania (Viannia) braziliensis* por meio de Real time PCR. Destas amostras analisadas, obteve-se a positividade em 01 (um) *pool* de *Ny. whitmani*, do local de coleta S26 (figura 2), que também foi o local onde foi coletado o maior número de flebotomos deste estudo. Por meio do Real time PCR encontrou-se uma taxa de infecção natural mínima por *Leishmania (Viannia) braziliensis* de 0,68 %.

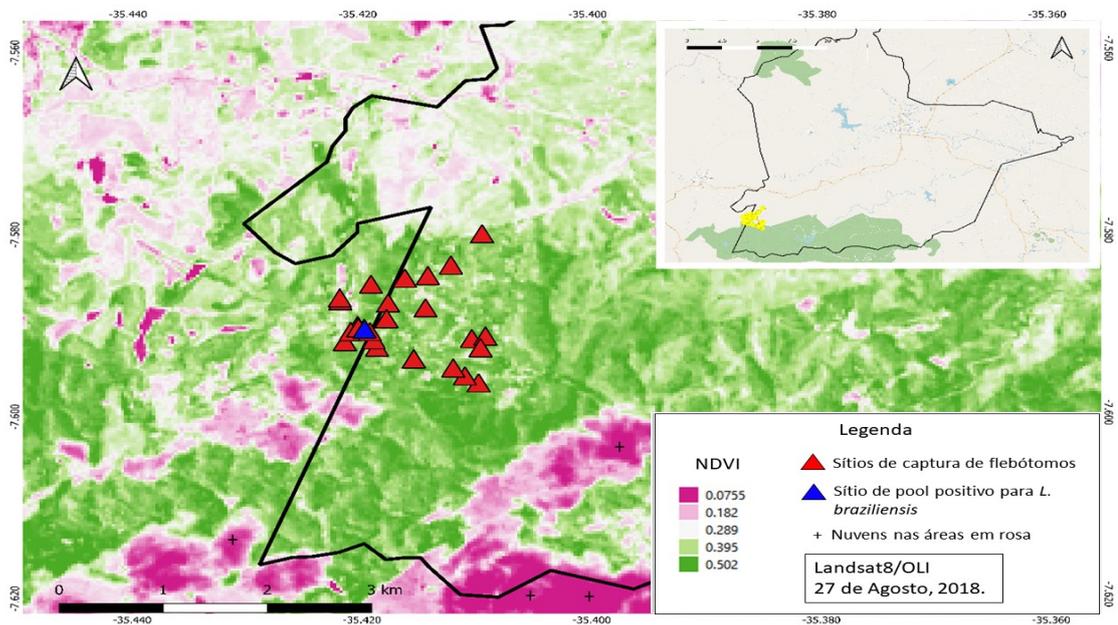
Tabela 1 - Distribuição por sítio de captura de flebotomíneos no distrito de Cruangi, Timbaúba/PE.

Sítio	Coordenadas geográficas		Total por sítio
	lat	long	
S1	-7.59649	-35.4097	258
S2	-7.59162	-35.41026	251
S3	-7.59136	-35.40908	74
S4	-7.5856	-35.41901	11
S5	-7.59572	-35.41089	224
S6	-7.59382	-35.41533	49
S7	-7.59046	-35.41963	10
S8	-7.59136	-35.40908	271
S9	-7.59013	-35.42019	229
S10	-7.58822	-35.41427	11
S11	-7.59485	-35.4119	29
S12	-7.59188	-35.42132	634
S13	-7.5908	-35.4208	62
S14	-7.59036	-35.42014	49
S15	-7.58739	-35.42169	32
S16	-7.58709	-35.42174	34
S17	-7.58766	-35.41754	36
S18	-7.58939	-35.41768	42
S19	-7.59251	-35.41852	48
S20	-7.59171	-35.41879	49
S21	-7.5908	-35.41914	34
S22	-7.58495	-35.41606	262
S23	-7.58467	-35.41406	14
S24	-7.58353	-35.41204	5
S25	-7.58009	-35.40931	9
S26	-7.59052	-35.4196	1.008
S27	-7.59263	-35.40951	9
<b>Total</b>			<b>3.744</b>

Tabela 2 - Distribuição por espécie e sexo de flebotomíneos capturados no distrito de Cruangi, Timbaúba/PE.

Espécies	Fêmeas		Machos		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>Nyssomyia whitmani</i>	1.342	42,4	1.825	57,6	3.167	84,59
<i>Migonemyia migonei</i>	119	23,4	390	76,6	509	13,60
<i>Evandromyia evandroi</i>	10	19,6	41	80,4	51	1,36
<i>Psychodopygus wellcomei</i>	04	26,7	11	73,3	15	0,40
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	00	00	02	100	02	0,05
<b>Total</b>	<b>1.475</b>	<b>39,4</b>	<b>2.269</b>	<b>60,6</b>	<b>3.744</b>	<b>100</b>

Figura 2 – Distribuição espacial dos pontos de coleta de flebotomíneos no distrito de Cruangi, Timbaúba.



## Discussão

Durante o período do estudo no município de Timbaúba foram registrados 92 indivíduos suspeitos para LTA e destes, 60 indivíduos foram diagnosticados como casos positivos. Em cada ano do presente estudo houve uma incidência mínima de 56.9 casos/100.000 hab. Com esta incidência, Timbaúba encontra-se com mais que o dobro da média nacional, registrada em 22.94 casos/100.000 hab. e com três vezes mais que a média da região Nordeste que é de 18.8 casos/100.000 hab. (BRASIL, 2017). Esses dados indicam uma endemia ativa com características predominantes de casos em população da faixa etária economicamente ativa (18 a 59 anos de idade) e em área rural do município, corroborando com dados de estudo anterior, também realizado em Timbaúba, que no período de 2012 a 2014, também encontraram predominância de casos nesta mesma faixa etária (ARAUJO *et al.*, 2016). Segundo Detoni *et al.* (2019), essa predominância de casos na faixa etária adulta pode levar a um impacto negativo na economia do município, principalmente em municípios de economia rural, que conforme estudo de Araujo *et al.* (2016), é o caso de Timbaúba.

Teoricamente, esse ambiente de trabalho está mais próximo dos habitats de flebotomíneos, o que segundo Araujo *et al.* (2016), aumentaria suas chances de serem infectados. Por outro lado como evidenciado neste estudo, 45% dos casos de

LTA foram de mulheres, indicando que a transmissão também ocorre no peridomicílio, podendo ser devido ao fato de que nessas áreas rurais de Timbaúba, as mulheres trabalham na própria residência e em seu entorno (ARAÚJO *et al.*, 2016). Em estudo realizado no município de Corte de Pedra na Bahia, numa série histórica de 20 anos entre 1988 a 2008, Jirmanus *et al.* (2012) encontraram como características para a LTA a predominância de adultos e trabalhadores rurais, com um detalhe de que nos últimos anos do estudo os casos estavam crescendo mais nas áreas urbanas, possivelmente pela adaptação dos flebótomos a novos habitats. Em concordância com este estudo estão as características gerais da LTA, no entanto em Timbaúba o caráter urbano da LTA ainda não foi estabelecido.

Como demonstrado no presente estudo, as análises espaciais, com os mapas de casos de LTA com NDVI e o mapa de calor (Kernel), mostraram que a distribuição dos casos de LTA no município estudado ocorreu de forma não homogênea, com clusters de casos possivelmente relacionados à fragmentos de Mata Atlântica. Evidenciando que a transmissão ocorre em áreas próximas a esses fragmentos de Mata Atlântica onde há povoamento limítrofe. Esta análise corrobora com o que foi descrito por Veiga Gonçalves (2019), em um estudo realizado em três municípios do Pará, relacionando a análise espacial com fatores de risco para a LTA, onde também encontrou concentração de casos próximos a áreas degradadas de florestas. A proximidade com fragmentos de Mata Atlântica também já foi descrita por Pedrosa e Ximenes (2009) como um fator de risco para a LTA em estudo epidemiológico de caso-controle realizado no Estado de Alagoas e em estudo ecológico de flebotomíneos feito em Paudalho, Pernambuco, Miranda *et al.* (2015) observaram o risco maior de transmissão nos indivíduos que trabalhavam ou habitavam áreas próximas a fragmentos de Mata Atlântica.

Os casos de LTA em Timbaúba concentram-se no distrito de Cruangi, área rural do município, tendo residências distantes uma das outras em mais de 500 metros, segundo a observação dos autores, e com ocupação desordenada, que ao longo dos anos, provavelmente se tornou condicionante ao desenvolvimento dos ciclos de transmissão da doença. A distância entre as residências já foi descrita como fator de risco para a LTA em Timbaúba, em um estudo de caso-controle, feito por Araujo *et al* (2016), que analisou diversos fatores de risco para esta doença, relatando que essa distância limita as opções de alimentação do flebótomo, o que

por consequência aumenta a possibilidade de se alimentar diversas vezes do mesmo indivíduo, aumentando as chances de infecção.

No presente estudo, dos 3.744 flebotomos capturados, foram identificados cinco espécies de gêneros diferentes. Outros estudos de ecologia de flebotomíneos realizados no estado de Pernambuco, encontraram uma diversidade maior de espécies. Dantas-torres *et al.* (2017) capturaram 24.606 flebotomos distribuídos por 25 espécies entre julho/2012 a julho/2014 em reserva militar em Mata Atlântica; Miranda *et al.* (2015) capturaram 5.167 flebotomos distribuídos em 19 espécies entre maio/2009 e maio/2014 no município de Ipojuca e Silva e Vasconcelos (2005) capturaram 1.173 flebotomos distribuídos por 11 espécies diferentes entre outubro/1999 a outubro/2000, na cidade do Recife, também em fragmento de mata atlântica; em comum nesses estudos está o fato de a maior parte das armadilhas de captura terem sido colocadas dentro de fragmentos de florestas, longe das residências, diferentemente de nosso estudo, onde as armadilhas foram postas apenas em domicílios e peridomicílios, e nenhuma dentro do fragmento de Mata Atlântica.

Ainda nesses mesmos estudos (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017; MIRANDA *et al.*, 2015; SILVA ; VASCONCELOS, 2005) a coleta no peridomicílio foi escassa, enquanto que neste estudo obteve-se abundante coleta de flebotomíneos no peridomicílio. Baseado nessas informações, é interessante notar que quanto mais o ambiente é natural, ou seja, composto de abundante vegetação nativa, mais há diversidade de espécies de flebotomos. Enquanto que apenas as espécies mais especializadas, que segundo Rangel e Lainson (2009) são aquelas que têm atração pelo ser humano como fonte hematófaga e em quem a *Leishmania* consegue se reproduzir, são as que sobressaem no peridomicílio.

Obteve-se neste estudo uma taxa de infecção natural de 0.68%, em um pool com dez fêmeas de *Ny. whitmani* corroborando com dados da literatura como os de Michalsky *et al.* (2011) com taxa de 3,9% em Jarnaúba-MG, Oliveira-Pereira *et al.* (2006) com taxa de 1,25% em Buriticupu-MA e Pereira Junior *et al.* (2015) com taxa de 0,3% em Tefé-AM, que encontraram valores entre 0,3 e 4,0%. A taxa de infecção natural torna-se importante por causa da abundância da *Ny. whitmani* na região e por ser essa espécie um vetor reconhecidamente competente (RANGEL; LAINSON, 2009).

No presente estudo, o pool de flebotomos de *Ny. whitmani* achado positivo no Real time PCR coincide com o local onde foram capturados mais espécimes de flebotomíneos e o sítio de captura coincide com a área de hotspots do mapa de calor (Kernel) encontrado para os casos humanos de LTA.

Observações baseadas em dados epidemiológicos e/ou experimentais sugerem ou incriminam algumas espécies de flebotomíneos como transmissoras das leishmanioses, associadas às espécies de leishmania pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Porém, apenas algumas espécies têm sido consideradas como importantes vetores, principalmente as espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, *Nyssomyia* e *Migonemyia* (RANGEL; LAINSON, 2009).

Para implicar uma espécie de flebotomo como vetor de uma região é necessário que preencha alguns requisitos que segundo Rangel e Lainson (2009) são abundância, positividade e presença em área de transmissão. Dantas-Torres *et al.* (2017) usando dos mesmos critérios, implicaram a *Lutzomyia choti* como vetor da LTA em fragmento de Mata Atlântica por ser o único encontrado positivo para *Leishmania* e por ser o mais abundante naquele estudo. Rangel e Lainson (2009) também discutem que para uma espécie de flebotomo ser vetor é necessário que o inseto tenha atração pelo ser humano como fonte hematófaga e que a *Leishmania* consiga se reproduzir em seu intestino, o que é fato para a *Ny. whitmani*

Das espécies que foram identificadas, três são conhecidas por transmitir em alguma região o agente causador da LTA (*Ny. whitmani*, *Mg. migonei*, *Ps. wellcomei*) (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017; RANGEL; LAINSON, 2009; SALES *et al.*, 2019). Apesar dessas espécies serem competentes para a transmissão da LTA, em nosso estudo podemos atribuir a *Ny. whitmani* a responsabilidade pela transmissão da *Leishmania braziliensis* no município de Timbaúba, pela frequência encontrada desta espécie no peridomicílio, pela positividade de DNA de *L. braziliensis*, por sua abundante presença nos focos de transmissão e pelas características inerentes da espécie, como sua atração por realizar a hematofagia nos humanos.

Nos estudos de Detoni *et al.* (2019) e de Miranda *et al.* (2011), ambos em centros urbanos como Londrina-PR e Governador Valadares-MG, a urbanização da LTA foi descrita, porém sem a identificação da espécie de flebotomo vetora. Semelhantemente, no estudo de Santos *et al.* (2009), realizado em Maringá-PR, em um distrito urbano, a *Ny. whitmani* foi identificada com suspeita de estar realizando a hematofagia até em períodos diurnos, o que pode servir de alerta para Timbaúba

quanto a urbanização da doença, pois identificamos essa mesma espécie como o principal vetor da LTA na área rural do município.

O acompanhamento dos casos e a produção de mapa de risco da leishmaniose tegumentar americana no município de Timbaúba colabora na evolução do conhecimento da doença na área, bem como fornece dados que demonstram claramente os focos da doença. A vigilância sobre as espécies de flebotomos que atuam no ciclo da LTA esclarece como a dinâmica da transmissão ocorre e mantém o alerta para o possível aparecimento de outras espécies de flebotomos.

## Referências

ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v.11, n. 4, 2017.

ALI, S. A.; AHMAD, A. Spatial susceptibility analysis of vector-borne diseases in KMC using geospatial technique and MCDM approach. **Modeling Earth Systems and Environment**. v. 5, n. 3, p. 1135–1159, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40808-019-00586-y>>.

ARAUJO, A. R. et al. Risk factors associated with american cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, 2016.

ARENAS, R. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

BRASIL. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. 2a ed. Brasília: [s.n.], 2017.

CASARIL, A. E. et al. Standardization of DNA extraction from sand flies: Application to genotyping by next generation sequencing. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 66–72, 2017.

DANTAS-TORRES, F. et al. Sand fly population dynamics and cutaneous leishmaniasis among soldiers in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–14, 2017.

DETONI, M. B. et al. Temporal and spatial distribution of american tegumentary leishmaniasis in North Paraná: 2010-2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–6, 2019.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae e Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 2014.

GUEDES, D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 8, 2017.

GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. Molecular detection of leishmania in phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 4, p. 357–360, 2014.

GUPTA, P. S.; SONI, M.; GUPTA, A. Neglected Tropical Diseases: Current Snapshot. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 2, p. 615–626, 2016.

JIRMANUS, L. et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 426–433, 2012.

MAGALHAES, T. et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–25, 2017.

MICHALSKY, É. M. et al. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por leishmania infantum chagasi em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 58–62, 2011.

MIRANDA, D. E. De O. et al. Ecology of sand flies in a low-density residential rural area, with mixed forest/agricultural exploitation, in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 146, p. 89–94, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.011>>.

MIRANDA, T. M. De et al. Descriptive study of American tegumentary leishmaniasis in the urban area of the Municipality of Governador Valadares, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 27–35, 2011.

NAZRI, C. D.; RODZIAH, I.; HASHIM, A. Distribution pattern of a dengue fever outbreak using GIS. **Journal of Environmental Health**, v. 71, n. 5, 2008.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N. et al. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 540–543, 2006.

PAIVA CAVALCANTI, M. et al. 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. 122–128, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2013.01.003>>.

PEDROSA, F. D. A.; XIMENES, R. A. De A. Sociodemographic and Environmental Risk Factors for American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the State of Alagoas, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 2, p. 195–201, 2009.

PEREIRA JÚNIOR, A. M. et al. Ecological aspects and molecular detection of *Leishmania* DNA Ross (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in phlebotomine sandflies

(Diptera: Psychodidae) in terra firme and várzea environments in the Middle Solimões Region, Amazonas State, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015.

PIRAJÁ, G.; LUCHEIS, S. A Vigilância Epidemiológica De Flebotomíneos Como Planejamento E Ações De Controle Nas Leishmanioses. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 4, p. 503–515, 2014.

RAMEZANKHANI, R. et al. Spatial analysis of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Iran based on environmental factors. *Geospatial Health*, v. 12, n. 2, p. 282–293, 2017.

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, n. 7, p. 937–954, 2009.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RUIZ-POSTIGO, J. A.; GROUT, L.; JAIN, S. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **World Health Organization, Weekly epidemiological record**, n. 25, p. 265–280, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>>.

SALES, K. G. D. S. et al. Home sweet home: Sand flies find a refuge in remote indigenous villages in north-eastern Brazil, where leishmaniasis is endemic. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3383-1>>.

SANTOS, D. R. et al. Observações sobre a atividade diurna de *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) na área urbana de Maringá, Paraná, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 3, p. 227–236, 2009.

SILVA, D. F.; VASCONCELOS, S. D. Flebotomíneo em fragmentos de Mata Atlântica na Região Metropolitana do Recife, PE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 264–266, 2005.

SILVA, J. A. O. et al. Sandflies in an endemic area for visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 569–573, 2019.

SOARES, D. C.; GARCEZ, L. M.; NETO, H. F. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Juruti, Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, n. 1, 2010.

VEIGA GONÇALVES, N. et al. Cutaneous leishmaniasis: Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará, Brazilian Eastern Amazon. **Journal of infection in developing countries**, v. 13, n. 10, p. 939–944, 2019.

## 5.2 SÉRIE TEMPORAL E ANÁLISE ESPACIAL DE CASOS DE LEISHMANIOSES VISCERAL E TEGUMENTAR DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL – 2009 A 2018.

### Introdução

É estimado que no mundo 350 milhões de pessoas estejam sob risco de contrair leishmaniose e que há 2 milhões de novos casos por ano (RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020). No período de 2001 a 2017 o Brasil reportou 98% dos casos de LV de toda a América, que apresentou um total de 59.769 novos casos, tendo uma média de 3.516 casos por ano (PAHO, 2019). No mesmo período, 940.396 novos casos de LTA foram notificados em toda a América, com uma média anual de 55.317 casos (PAHO, 2019).

A LV encontra-se estabelecida aos ambientes urbanos e rurais, e está presente em todas as regiões do Brasil, tendo uma incidência média nacional de 1,8 casos/100 mil habitantes e uma incidência média de 3,2 casos/100 mil habitantes na região Nordeste (BRASIL, 2020). Sendo uma doença grave e sistêmica, a LV deve ser monitorada visando a prevenção, vigilância e controle (BI *et al.*, 2018).

Outro agravante da LV é a coinfeção com o HIV, no Brasil a incidência desta coinfeção aumentou de 0,7% em 2001 para 8,5% em 2012 (LINDOSO *et al.*, 2016). A coinfeção está associada a altas falhas iniciais no tratamento, recidivas, efeitos tóxicos dos medicamentos e mortalidade (LINDOSO *et al.*, 2016).

O Brasil está entre os cinco países com maior número de casos de LTA nas Américas, destacando-se as regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017). Entre 1990 e 2011, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2017) notificou taxas de incidência nos estados variando entre 3,8 a 22,9 casos/100 mil habitantes e na região Nordeste uma incidência média de 18.8 casos/100 mil habitantes. Devido à sua ampla área de endemidade, a LTA é uma das afecções dermatológicas que mais merece atenção, pelo risco das lesões provocarem deformidades incapacitantes, com reflexo psicossocial e importante reflexo econômico, sobretudo nos indivíduos afetados (BEZERRA *et al.*, 2018).

As análises baseadas em tendência temporal podem ser úteis na avaliação de estratégias e ações de vigilância e controle em doenças endêmicas, pois permitem enxergar a dinâmica da doença ao longo do tempo em termos de incidência, mortalidade e letalidade (BEZERRA *et al.*, 2018; CAVALCANTE *et al.*,

2020). Outra importante ferramenta de vigilância é o Sistema de Informação Geográfica (SIG), baseado em geoprocessamento, usado para analisar padrões espaciais de distribuição de doenças, onde podem ser identificadas áreas de risco, fatores associados e indicar áreas prioritárias para o desenvolvimento de ações de controle (CAVALCANTE *et al.*, 2020; GUEDES *et al.*, 2017).

A utilização dessas ferramentas permite estratificar o risco da doença, que é uma importante ferramenta de vigilância, e proporciona um melhor conhecimento sobre o problema de saúde, e apoia os gestores e profissionais da saúde na adoção de ações e na priorização de áreas a serem trabalhadas (PAHO, 2019). Desta maneira, estudos regionais, voltados para problemas locais tendem a ser necessários para o efetivo controle da leishmaniose.

De acordo com a literatura (ARAUJO *et al.*, 2016; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2017; PESSOA-E-SILVA *et al.*, 2019), boa parte dos municípios de Pernambuco são endêmicos para ambas as formas de leishmaniose, dentro deste contexto esse estudo se debruçou em analisar pela primeira vez a tendência temporal e espacial, em um período de 10 anos (2009 a 2018), esta endemia no estado de Pernambuco, Brasil.

## **Material e métodos**

### **Área de estudo**

O estado de Pernambuco está localizado na região Nordeste do Brasil, tem como capital a cidade de Recife, e possui um território de 98.076,109 Km<sup>2</sup>, está limitado ao norte com os estados da Paraíba e Ceará, ao sul com os estados de Alagoas e Bahia, ao oeste com o estado do Piauí, além de ser banhado pelo Oceano Atlântico e possui uma população estimada de 9.557.071 de habitantes (IBGE, 2018).

### **Fonte e coleta de dados**

O estudo foi realizado com dados secundários, a partir do banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Foram investigados todos os casos confirmados de LV e de LTA do Estado de Pernambuco, Brasil, notificados no período de 2009 a 2018. Foram usadas as informações sociodemográficas de censo 2010, contidas no banco de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.

### **Variáveis do estudo**

Foram analisados dois bancos de dados composto por 1.224 casos de LV, e 3.675 casos de LTA, e estudadas 05 variáveis extraídas dos mesmos. Foram utilizadas as variáveis: sexo; idade (divididos por faixa etária, crianças 0 a 14 anos, adolescentes 15 a 19 anos, adultos 20 a 59 anos e idosos > 60 anos); escolaridade, forma clínica; coinfeção com HIV e evolução do caso.

### **Análise dos dados**

A incidência de casos foi calculada dividindo o número de novos casos pela população de todo o estado e multiplicando por 100.000. O coeficiente de letalidade para LV foi obtido dividindo o número de óbitos pelo total de casos confirmados e multiplicando por 100.

A correlação espacial foi calculada através do índice de Moran global, que permite identificar se há dependência espacial entre os dados. O resultado do Moran global é definido no intervalo de -1 a +1 com nível de significância de 5%, onde haverá correlação espacial quando os resultados forem diferentes de 0.

### **Análise estatística**

Os dados coletados foram tratados no software *Microsoft Excel*<sup>®</sup>, para o tratamento estatístico foi utilizado o software *BioEstat*<sup>®</sup> 5.0. O software *TerraView* 4.2.2<sup>®</sup> foi utilizado para a obtenção dos indicadores locais de autocorrelação espacial, os mapas de espalhamento de Moran, além do cálculo do índice global de Moran.

### **Aspectos éticos**

Este estudo se enquadra na resolução n° 510 de 07 de Abril de 2016 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil por se tratar de uma pesquisa com fonte oriunda de banco de dados onde suas informações são agregadas sem a possibilidade de identificação de indivíduos, justificando a ausência do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em humanos.

### **Resultados**

Os casos de LV e LTA obtidos pelos dados do SINAN foram usados em sua totalidade para a análise das variáveis “sexo”, “forma clínica” (LTA) e “coinfecção por HIV” (LV). Para as variáveis “faixa etária” e “escolaridade” foram retirados das análises os dados indicados como em branco ou ignorado, por não contribuírem para a análise objeto dessas variáveis. Na variável “desfecho” foram retirados das análises os dados indicados como em branco, ignorado e transferido, por ser entendido que esses itens não contribuem para a verificação do desfecho da doença em Pernambuco.

Na tabela 1 observa-se que para a LV, a população infectada tem como características principais a predominância de indivíduos do sexo masculino, das faixas etárias de crianças e de adultos, com predominância da escolaridade ensino fundamental, sem coinfecção por HIV e tendo o desfecho cura como a característica predominante final.

Tabela 1 - Caracterização dos casos de LV e LTA no estado de Pernambuco, Brasil no período de 2009 a 2018.

Variáveis	Indicadores	LV		LTA	
		n	(%)	n	%
<b>Sexo</b>	Feminino	438	(35.78)	1.464	(39.84)
	Masculino	786	(64.22)	2.211	(60.16)
<b>Faixa etária</b>	0 – 9 anos (crianças)	535	(43.71)	443	(12.05)
	10 – 19 anos (adolescentes)	126	(10.29)	725	(19.73)
	20 – 64 anos (adultos)	504	(41.18)	2.128	(57.90)
	> 65 anos (idosos)	59	(4.82)	379	(10.31)
<b>Escolaridade</b>	Analfabeto	69	(14.02)	325	(13.91)
	E. Fundamental	335	(68.09)	1.749	(74.87)
	E. Médio	77	(15.65)	225	(9.63)
	E. Superior	11	(2.24)	37	(1.58)
<b>Forma Clínica</b>	Cutânea	na	na	3.553	(96.68)
	Mucosa	na	na	122	(3.32)
<b>Co-infecção HIV</b>	Sim	76	(6.21)	na	na
	Não	778	(63.56)	na	na
	Ignorados	370	(30.23)	na	na
<b>Desfecho</b>	Cura	883	(87.51)	2682	(97.99)
	Abandono do tratamento	5	(0.50)	42	(1.53)
	Óbito/Leishmaniose	87	(8.62)	4	(0.15)
	Óbito /outras	34	(3.37)	9	(0.33)

n = número de pacientes; na = não avaliado

Na mesma tabela, observa-se a caracterização dos casos de LTA, com as variáveis sexo masculino, adultos, ensino fundamental, forma cutânea e desfecho de cura sendo predominantes para este tipo de leishmaniose em Pernambuco, no período estudado.

Na figura 1A observa-se o cruzamento das variáveis faixa etária e sexo para LV. Pode-se perceber o aumento da prevalência do sexo masculino na faixa de idade adulta, tendo na faixa de idade de crianças uma semelhança na proporção dos sexos. Na figura 1B tem-se o gráfico do cruzamento das variáveis faixa etária e sexo para a LTA, que apresenta uma diferença estatística para a faixa etária de adultos em relação a crianças e idosos com  $p < 0,05$  na análise de variância entre as médias das populações nas faixas etárias, tendo também uma maior prevalência aparente do sexo masculino.

Figura 1 – Faixa etária versus sexo para LV (A) e LTA (B)

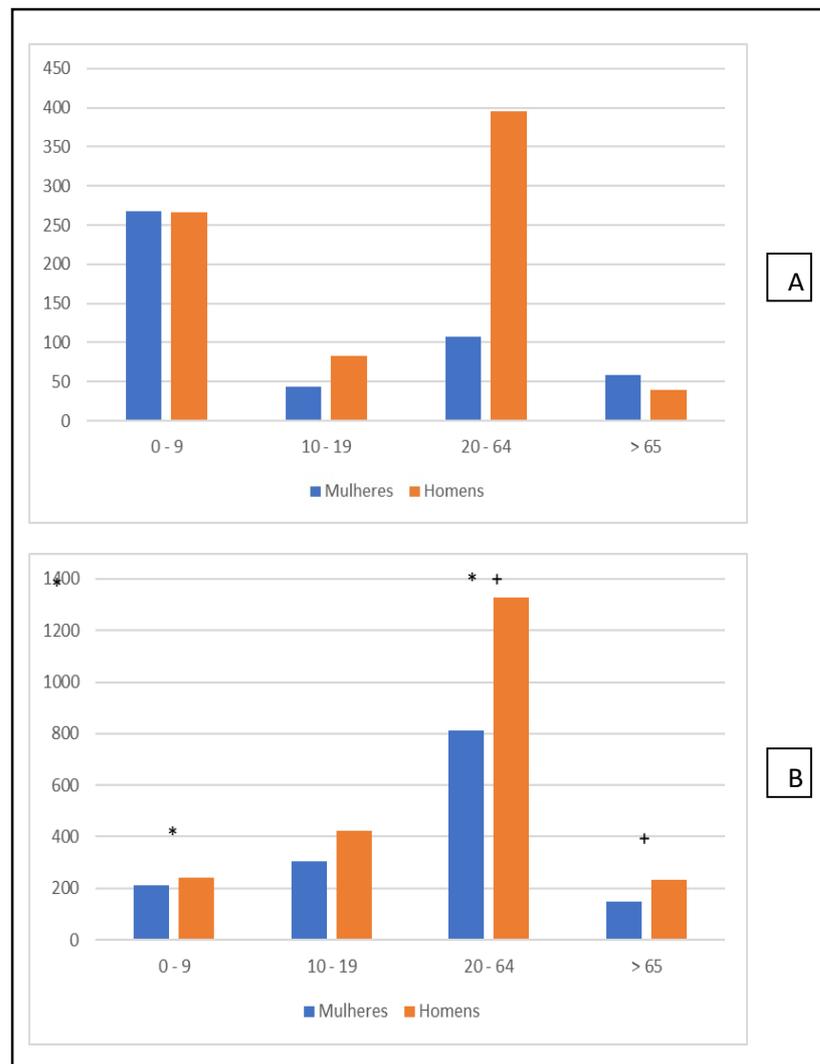
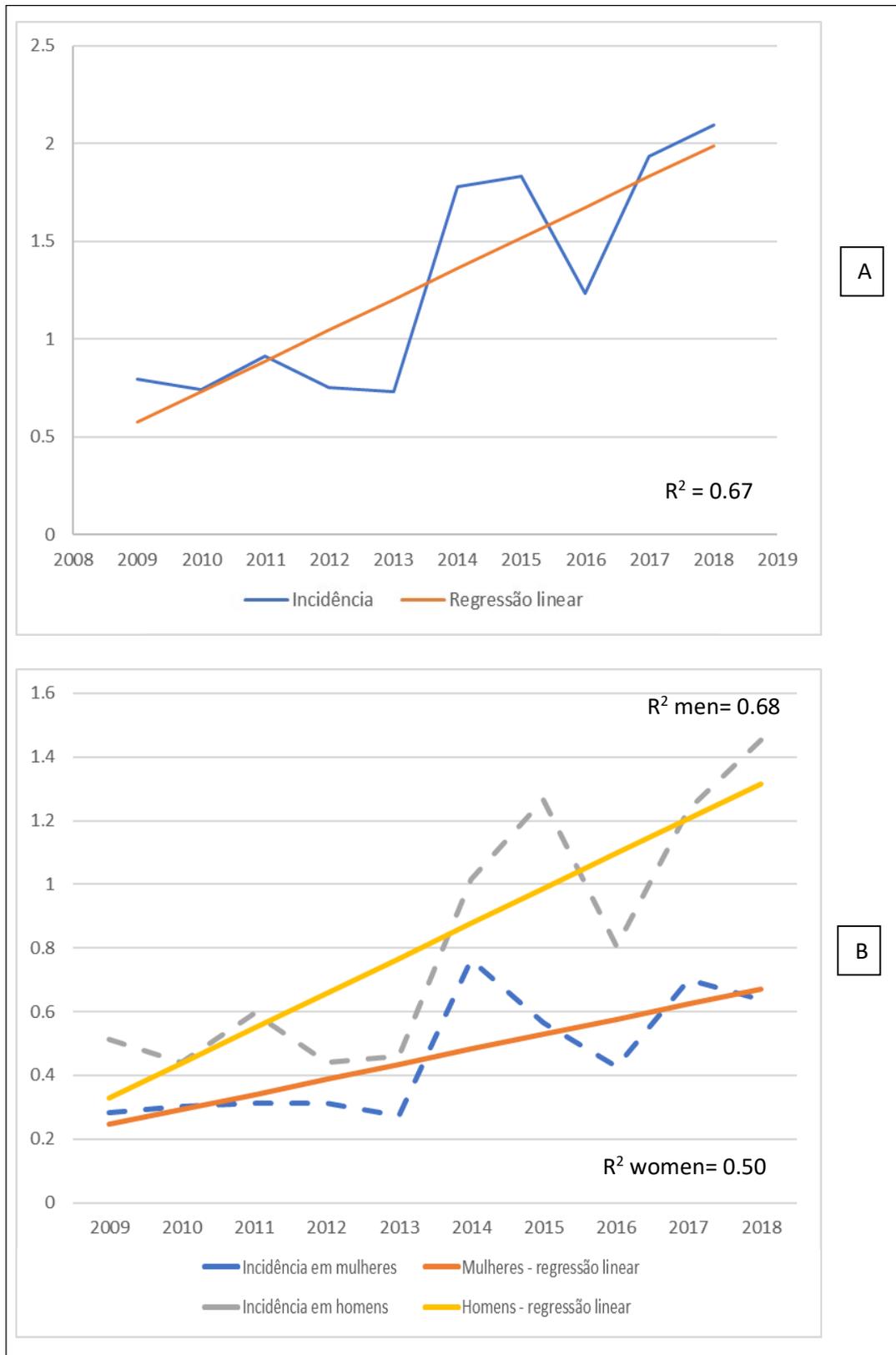


Figura 2 - Incidência e incidência por regressão linear da leishmaniose visceral por ano (A) e por sexo e ano (B) no estado de Pernambuco, no período de 2009 a 2018.



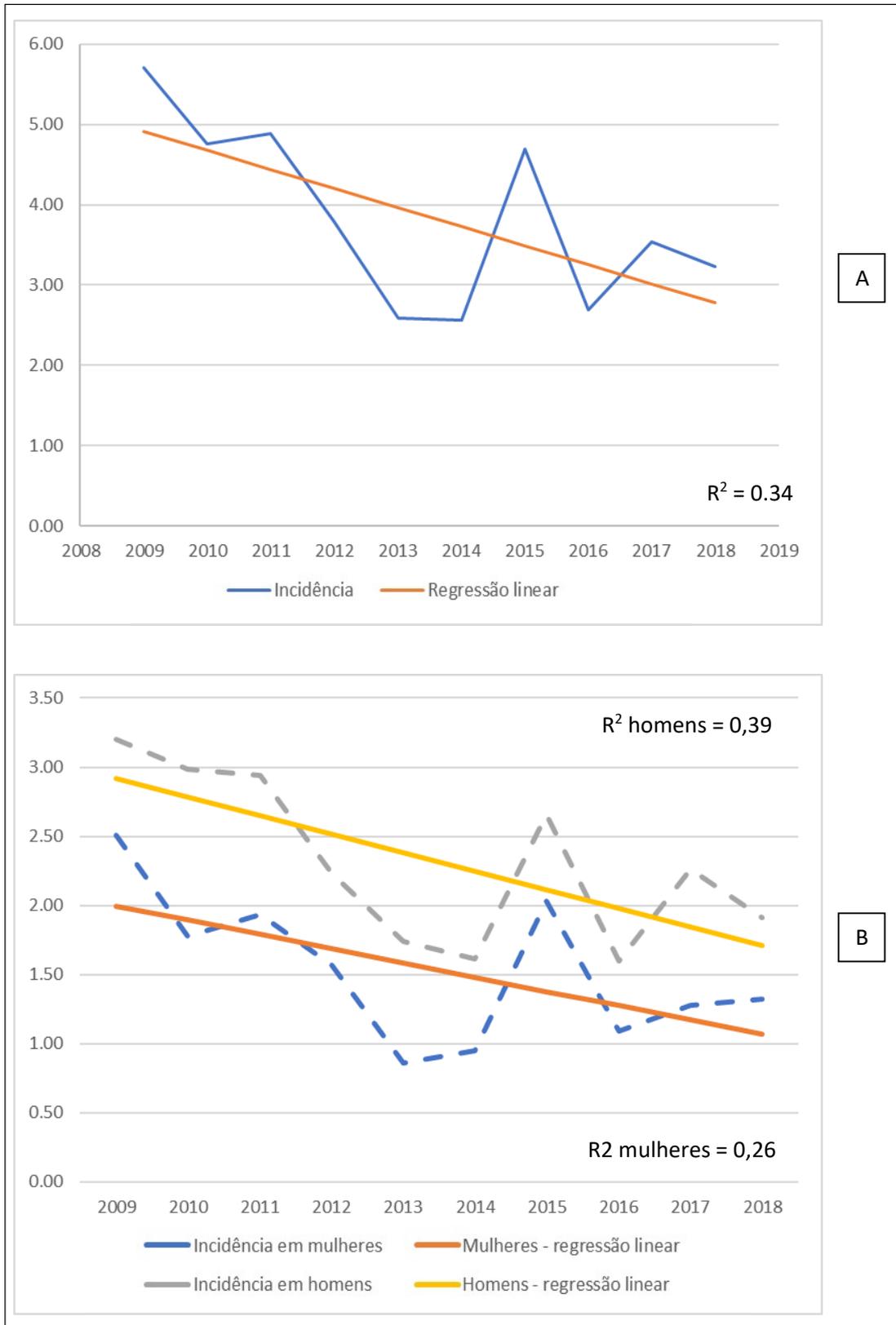
Na figura 2A observa-se uma linha de tendência que evidencia o aumento na taxa de incidência de LV no estado ao longo do período estudado com um  $R^2$  relativamente alto (0,67  $p < 0,05$ ). Destacam-se um aumento brusco da taxa de incidência que houve entre os anos de 2013 a 2014 indo de 0,73 casos/100 mil hab. a 1,77 casos/100 mil hab., seguido de uma leve diminuição da taxa de incidência em 2016 (1,23 casos/100 mil hab.), com novo aumento em 2017 (1,93 casos/100 mil hab.).

Também é apresentada na figura 2 a incidência de LV no estado de Pernambuco por ano e por sexo e a razão das taxas dos sexos masculino e feminino. Verifica-se que a taxa de incidência de LV entre pessoas do sexo masculino tem o mesmo comportamento das do sexo feminino durante os anos em estudo, porém a incidência no sexo masculino é superior em todos os anos. No que se refere ao  $R^2$ , observa-se um valor relativamente alto com relação a modelagem das taxas de LV entre pessoas do sexo masculino (0,68  $p < 0,05$ ), e para a taxa entre as pessoas do sexo feminino o valor obtido foi de 0,50 ( $p < 0,05$ ).

A LTA em Pernambuco, no período estudado, apresenta uma linha de tendência que demonstra uma inesperada diminuição na taxa de incidência no estado (Figura 3A) durante o período estudado, tendo um  $R^2$  relativamente baixo (0,34  $p < 0,05$ ). No gráfico da incidência da LTA em Pernambuco por ano e por sexo (Figura 3B) observa-se o mesmo comportamento de incidência nos dois sexos, com  $R^2$  relativamente baixos (masculino: 0,39  $p < 0,05$  e feminino: 0,26) com predominância do sexo masculino.

Na figura 4 tem-se os dados percentuais da relação dos casos com e sem coinfeção com HIV. Observa-se que cerca de 10% dos casos ocorrem com infecção com HIV, tendo uma leve diminuição dessa porcentagem a partir do ano de 2014. No ano de 2015 houve apenas a notificação de 01 caso de coinfeção, voltando a normalidade das notificações em 2016. Nota-se que os dados estão com um viés na determinação da taxa de coinfeção, devido ao grande percentual de casos onde foi ignorada esta informação.

Figura 3 - Incidência e incidência por regressão linear da LTA por ano (A) e por sexo e ano (B) no estado de Pernambuco, no período de 2009 a 2018.



No período de 2009 a 2018, em Pernambuco, foram notificados 87 óbitos causados por leishmaniose visceral. Na figura 5 pode-se observar o gráfico de mortalidade comparada com as taxas de letalidade da LV. No ano de 2010 observa-se uma taxa de letalidade maior que 14%, com uma abrupta diminuição no ano seguinte (4.76%). Tendo o número de casos aumentado nos anos seguintes e os óbitos também em contrapartida, a taxa de letalidade tendeu a permanecer abaixo dos 10% dos casos, evidenciando uma diminuição em sequência da taxa de letalidade nos anos de 2015 (10.7%) a 2018 (6.76%).

Figura 4 - Proporção de casos de coinfeção leishmaniose visceral – HIV em Pernambuco, Brasil, no período de 2009 a 2018.

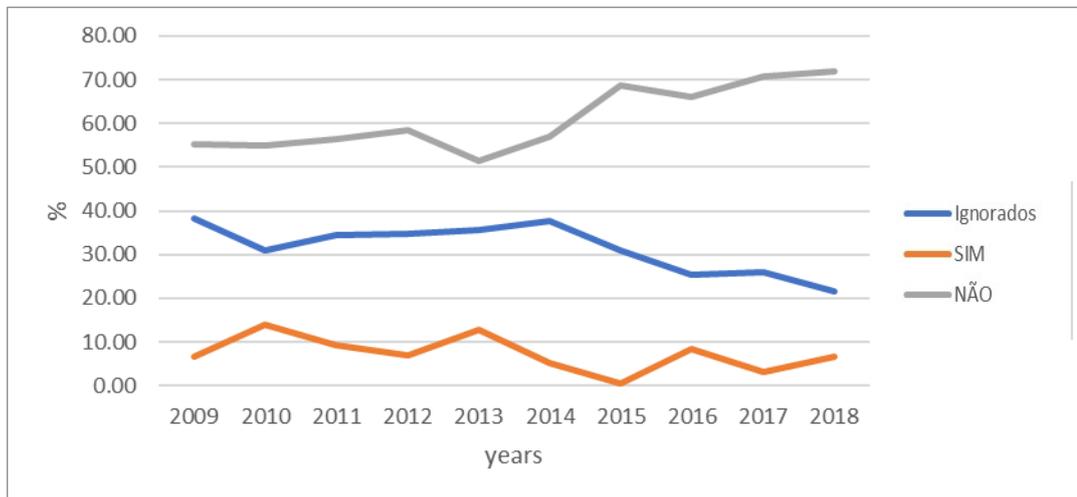


Figura 5 - Número de mortes e taxa de letalidade por leishmaniose visceral em Pernambuco, Brasil, no período de 2009 a 2018.

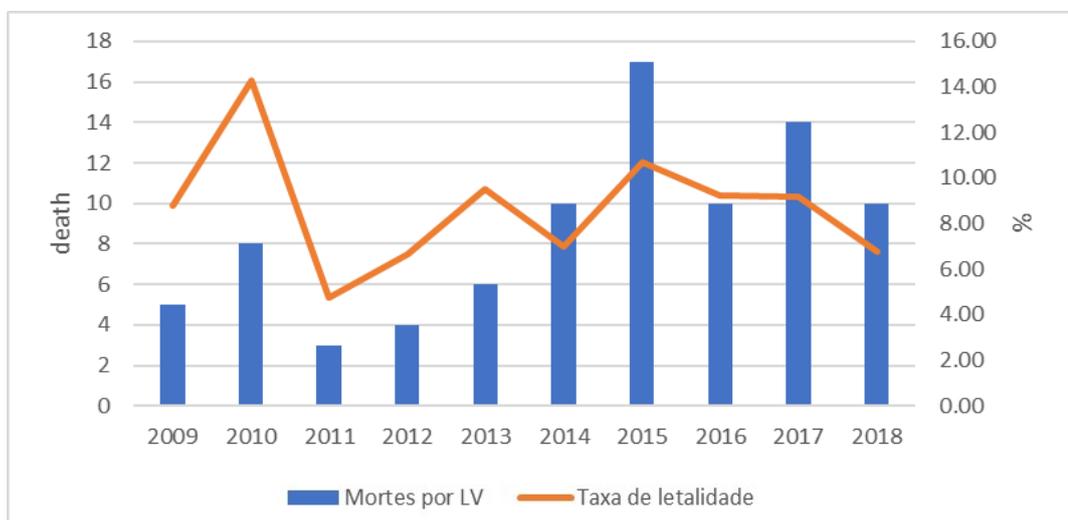


Figura 6 - *Moran map* da taxa de incidência de leishmaniose visceral em Pernambuco, Brasil, no período de 2009 a 2018.

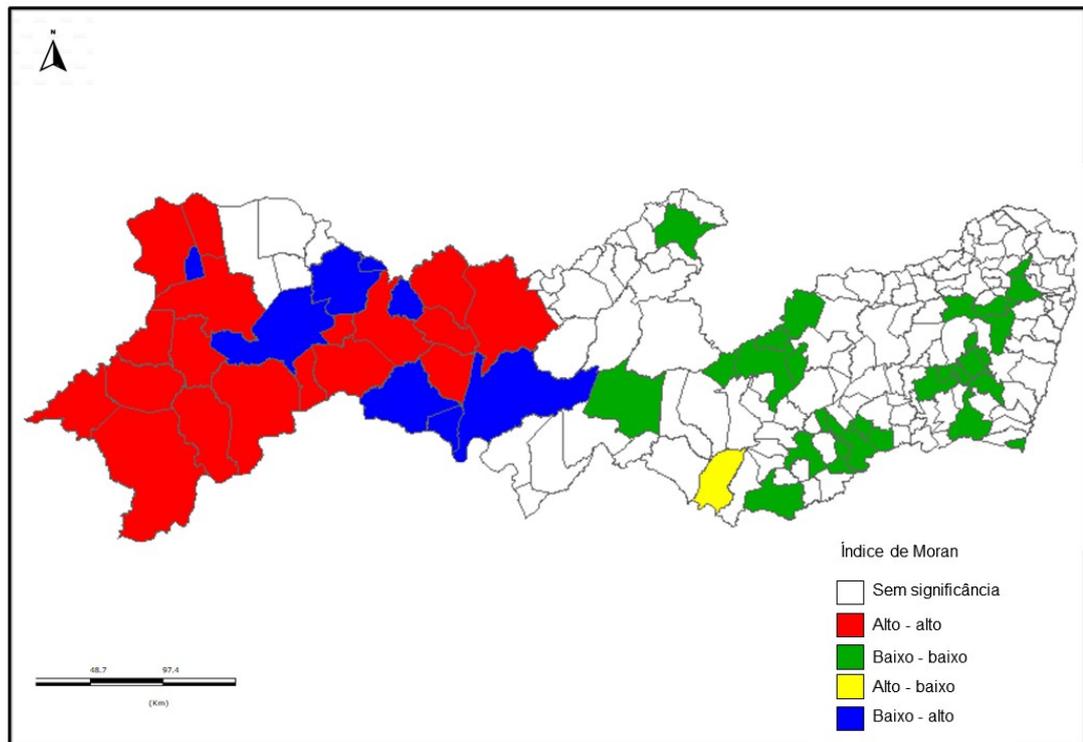
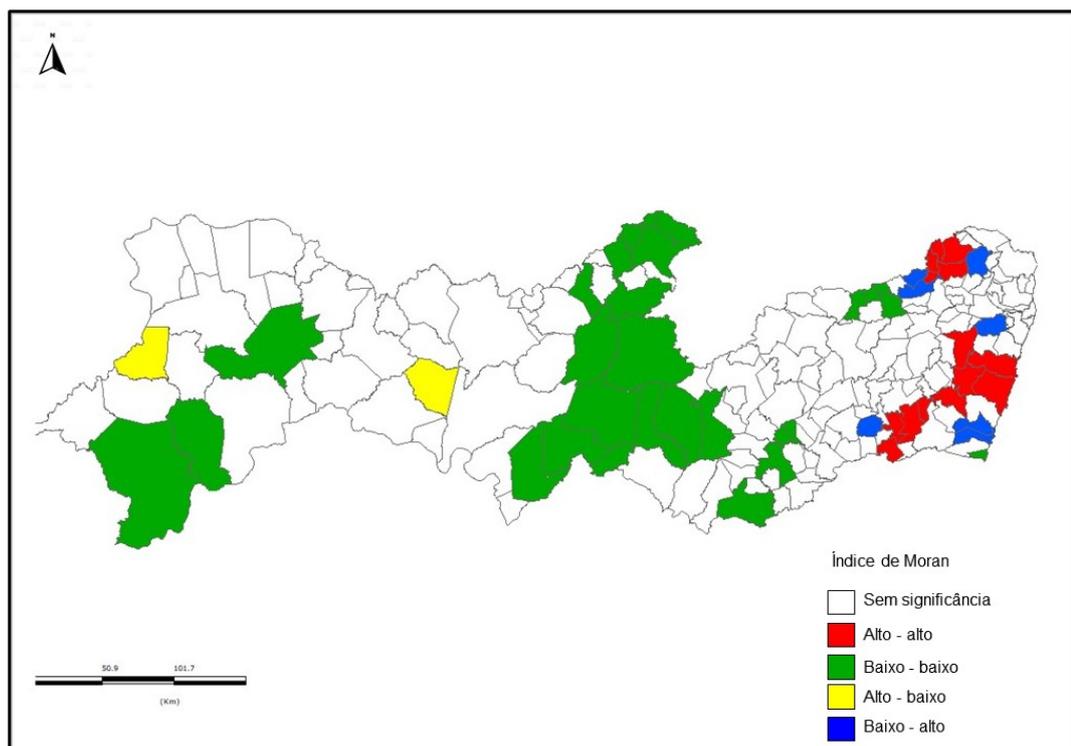


Figura 7 - *Moran map* da taxa de incidência de leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco, Brasil, no período de 2009 a 2018.



Na análise estatística espacial, o índice global de Moran obtido para este estudo no período de 2009 a 2018 para a LV em Pernambuco foi de  $I = 0,35$  ( $p < 0,01$ ). Portanto, indica que há correlação espacial positiva, demonstrando que os municípios com LV são espacialmente dependentes, conforme o demonstrado na figura 6. Os clusters foram identificados considerando a similaridade entre os municípios e categorizados em grupos de alta incidência localizados na região oeste do estado, mais precisamente no sertão do São Francisco e Central. Aglomerados de baixa incidência encontram-se localizados na parte leste do estado, nas regiões das Matas norte e sul e região do Agreste meridional. Na região do sertão também estão os municípios de baixa incidência que são vizinhos aos de alta incidência, caracterizando um risco estatístico. Neste estudo obtivemos apenas 1 (um) município de relativa alta incidência perto de municípios com baixíssimas incidências, o município de Águas Belas.

O índice global de Moran obtido para LTA em Pernambuco neste estudo no período de 2009 a 2018 foi de  $I = 0,26$  ( $p < 0,01$ ). Na figura 7 observam-se os clusters de alta incidência no leste do estado em municípios das regiões da Mata norte e sul. Os aglomerados de baixa incidência encontram-se no oeste do estado nas regiões do Agreste e parte do Sertão, tendo nessas áreas municípios isolados de alta incidência que são vizinhos a outros de baixa incidência.

## **Discussão**

Verificou-se para a LV que o perfil de casos notificados foi o de pacientes do sexo masculino, de faixas etárias de adultos e crianças, apenas com ensino fundamental. Esse perfil de pacientes corrobora com os encontrados por Cavalcante *et al.* (2020) para a LV, que encontraram em um estudo epidemiológico temporal de 14 anos no estado do Ceará, também localizado na região nordeste do Brasil, um perfil de pacientes semelhantes, porém diferentemente, naquele estado, a faixa etária de crianças com até 5 anos foi a mais acometida pela LV.

No entanto em Pernambuco, no presente estudo, tanto a faixa etária de crianças como a de adultos têm percentuais de casos semelhantes, tal fato pode ser atribuído ao tipo de ocupação profissional exercido pelos adultos acometidos com a LV, sendo a maioria relacionados a ocupações agrícolas (CARDIM *et al.*, 2016). Todavia, quando comparados aos dados das Américas (PAHO, 2019), os resultados de Pernambuco são semelhantes, onde os percentuais de casos das faixas etárias

são próximas entre as faixas de idade de crianças e adultos (39,1% e 34,7% respectivamente nas Américas).

Dos pacientes acometidos com a LTA em Pernambuco, no período deste estudo, observou-se a prevalência maior no sexo masculino, adultos, com a forma cutânea da doença e com apenas o ensino fundamental. Observou-se que há uma diferença significativa entre os casos notificados na faixa etária adulta e aqueles notificados nas faixas de crianças e idosos, demonstrando que os adultos são os mais acometidos com a LTA em Pernambuco.

Araujo *et al.* (2016) no município de Timbaúba, em um estudo de caso-controle, trabalharam com o mesmo perfil de pacientes e encontraram forte associação entre a LTA e pessoas do sexo masculino. Jirmanus *et al.* (2012), numa série histórica de 20 anos entre 1988 a 2008, realizada no município de Corte de Pedra na Bahia e Veiga Gonçalves *et al.* (2019), em um estudo de distribuição espacial de casos de LTA no Pará entre 2012 a 2016, encontraram também o mesmo perfil de pacientes para a LTA, e com significativa associação a pessoas do sexo masculino, corroborando com o encontrado neste estudo e confirmando esta característica da LTA no Brasil de ser ligada mais fortemente ao sexo masculino.

Em ambos os tipos LV e LTA, a variável escolaridade no nível fundamental aparece como mais predominante entre os casos notificados. Esses dados corroboram com as características de que a população menos favorecida é a mais acometida pelas doenças negligenciadas, principalmente as leishmanioses no Brasil (ARAUJO *et al.*, 2016; FURTADO *et al.*, 2015; PAHO, 2017; PEDROSA; XIMENES, 2009).

Em Pernambuco, a incidência da LV aumentou de 0,79 casos/100 mil habitantes em 2009 para 2,09 casos/100 mil habitantes em 2018. A incidência linear com  $R^2= 0,67$  evidencia um crescimento preocupante da LV no estado. Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006), ao analisarem um período de 1990 a 2001 observaram um grande aumento na incidência a partir do ano 2000, onde a doença chegou a ser notificada em 78% dos municípios Pernambucanos, onde segundo os autores, a maioria dos casos parece estar associada a pressão antrópica sobre o ambiente e ocupação desordenada do espaço físico, tendo outro aspecto importante a ser considerado, a capacidade de domiciliação do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, que pode ser encontrado em praticamente todo território pernambucano.

De forma inversa, a LTA em Pernambuco, no período de 2009 a 2018 apresentou uma incidência linear com tendência a diminuição dos casos, dado que se repete para ambos os sexos. Estes achados corroboram com os encontrados por Maia-Elkhoury *et al.* (2016), que avaliando as incidências de LTA para as Américas, observaram no período de 2006 a 2011 uma tendência de diminuição da infecção no Brasil, segundo os autores, assim como alguns fatores podem ser responsáveis pelo aumento da incidência da LTA, como o desmatamento, modificações no uso da terra, aumento da migração, urbanização, mudança climática, etc; esses mesmos fatores em uma situação inversa poderiam também ser os responsáveis pela diminuição da incidência.

No Brasil a coinfeção LV-HIV aumentou de 0,7% em 2001 para 8,5% em 2012 (LINDOSO *et al.*, 2016). A coinfeção da LV com o HIV, no presente estudo, foi encontrada em 6,21% dos casos. Esses resultados diferem dos encontrados por Araújo A.C., *et al.* (2016), no estado de Pernambuco, no município de Petrolina, onde coinfeção com o vírus da HIV ocorreu em 14,5% dos casos em um período de 2007 a 2013. Semelhantemente, nos dados consolidados para as Américas (PAHO, 2019), a percentagem de coinfeção para o ano de 2016 foi de 10,14%. Considerando que nos dados deste estudo foram incluídos os pacientes que tiveram a informação sobre coinfeção ignorada, é razoável afirmar que a coinfeção LV-HIV em Pernambuco segue a tendência de até 10% dos casos, o que torna a vigilância epidemiológica ativa da LV necessária na prevenção de maiores complicações na evolução da doença.

A taxa de letalidade da LV em Pernambuco variou de 14,29% em 2010 para 4,76% em 2011 e se estabilizando em 6,76% em 2018. Essa diminuição pode indicar uma melhora no diagnóstico e no tratamento específico da LV. Essa tendência é semelhante a de outro estudo recente de análise espacial da LV, realizado no Ceará, onde Cavalcante *et al.* (2020) também perceberam essa diminuição. Esses dados podem ser o reflexo dos esforços do ministério da saúde do Brasil em diminuir a letalidade da LV no Brasil, principalmente por ser mais viável do que tentar diminuir a taxa de incidência da doença (CAVALCANTE *et al.*, 2020; WERNECK, 2016)

Vários estudos, como os de Guedes *et al.* (2010), Kawa *et al.* (2010), Cardim *et al.* (2013, 2016), Furtado *et al.* (2015), Fontoura *et al.* (2016), Cardoso *et al.* (2019) e Veiga Gonçalves *et al.* (2019) realizaram análises por meio de técnicas de

geoprocessamento para definir as áreas de risco para ocorrência de agravos e sua relação com determinantes socioambientais.

O estudo de Cardim *et al.* (2016) ao analisar a expansão da leishmaniose visceral em São Paulo, detectou que esta vem ocorrendo no sentido oeste-leste, com destaque para o papel das rodovias neste processo. A análise espacial e temporal demonstrou, em diferentes espaços e períodos, uma ciclicidade na ocorrência da doença.

Em Pernambuco observou-se diferenças na ocupação espacial nos dois tipos de leishmaniose. Na LV observa-se correlação espacial positiva, pelo índice global de Moran, e áreas de maior prioridade na região oeste do estado, no Sertão do estado e alguns municípios do Agreste. Ao todo foram identificados 18 municípios de alta prioridade para a LV em Pernambuco. Os municípios com maior incidência foram Salgueiro (234,04 casos/100 mil hab.), Carnaubeira da Penha (163,00 casos/100 mil hab.) e Santa Cruz (140,17 casos/100 mil hab.).

A análise de autocorrelação espacial, por meio do Índice Global de Moran, apresenta associação espacial positiva ( $I > 0$ ), ou seja, aponta indícios de que a taxa de incidência de casos de leishmaniose em um município de Pernambuco, seja correlacionada no espaço com o valor médio da taxa de ocorrências nos municípios vizinhos (SAUDE, 2007).

Para Cerbino Neto *et al.* (2009), a presença de autocorrelação espacial implica sugerir que áreas próximas apresentam taxas mais semelhantes do que o que seria esperado, caso sua distribuição fosse aleatória, indicando que o fenômeno estudado apresenta dependência espacial.

Apesar do intenso fluxo migratório intermunicipal, sobretudo do interior do estado para a Região Metropolitana do Recife, e de muitas famílias vindas do interior se estabelecerem na periferia das cidades de médio e grande porte, formando aglomerados densamente povoados que apresentam precárias condições de infraestrutura e saneamento básico e desses fatores estarem relacionados a picos epidêmicos da LV em outros estados segundo Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006) e Furlan (2010), em Pernambuco as áreas de maior risco para a LV continuam a ser o Sertão e o Agreste do estado.

Esta situação pode indicar que esses municípios são os que mais sofreram ações antrópicas, impactando o ambiente e favorecendo a adaptação dos flebótomos em áreas habitadas. De fato, a ação humana na degradação de áreas

antes intocadas e o povoamento próximos a essas mesmas áreas favorece a disseminação dos flebótomos e aumenta as chances de infecção por leishmaniasis (ARAUJO *et al.*, 2016; VEIGA GONÇALVES *et al.*, 2019).

Em estudo recente no estado do Ceará, Cavalcante *et al.* (2020) observaram clusters de LV no leste do estado e concentrado na região do Cariri e no litoral, não havendo formação de aglomerados no sertão do Ceará. Esses resultados diferem dos nossos achados quanto a incidência no sertão, porém concordam no aspecto de que as áreas de maior prioridade estão localizadas em apenas um polo do estado.

Na formação de clusters para a LTA em Pernambuco obteve-se um padrão diferente do observado para a LV, tendo as áreas de maior prioridade localizadas no leste do estado, nas regiões da Mata Norte e Sul. Para a LTA o Agreste e o Sertão são áreas de baixa prioridade para a LTA. Nos aglomerados de maior prioridade para a LTA estão em 14 municípios, sendo os de maior incidência por 100 mil habitantes os municípios de Vicência (82,52), Escada (41,18) e São Vicente Férrer (39,48). De fato, os municípios das Matas Norte e Sul de Pernambuco são consideradas áreas de grande risco para a LTA, tendo sido realizadas diversas investigações de casos, e de flebótomos e de cães nos municípios da região (ARAUJO *et al.*, 2016; DANTAS-TORRES *et al.*, 2017; SILVA; BRAGA, 2008).

A identificação de municípios em clusters de alta prioridade para a leishmaniose é importante porque esses municípios podem influenciar na disseminação da doença para os seus vizinhos, tendo a possibilidade de propagação de hospedeiros reservatórios e de flebótomos (CARDOSO *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2017). Outros fatores importantes para o aumento das taxas de incidência e a expansão de áreas de alta prioridade para LTA pode ser a migração de hospedeiros reservatórios, e da presença de flebótomos vetores na área, aumentando assim as chances de infecção (CARDOSO *et al.*, 2019; SALIMI *et al.*, 2018).

Esses fatores caracterizam a importância da vigilância epidemiológica associada com a análise por geoprocessamento, pois mesmo sem a migração de infectados e degradação do meio ambiente, as leishmanioses podem migrar de uma região para outra.

Os dados para o presente estudo foram obtidos do SINAN, que é um sistema nacional, aberto, e portanto, secundário e é alimentado pela notificação e investigação de casos de doenças e agravos que constam da lista nacional de

doenças de notificação compulsória (BRASIL, 2019). Este tipo de sistema pode comportar o viés de digitação e, principalmente para as doenças negligenciadas, pode não reproduzir com fidelidade a totalidade dos casos existentes, mas apenas os que procuraram o serviço de saúde e foram notificados (NASCIMENTO; MAIA-HERZOG; SABROZA, 2012). O uso de dados secundários e de notificação passiva, com a provável ocorrência de subnotificação de casos, e o uso de delineamento ecológico podem ser considerados limitações deste estudo, no entanto nossos dados demonstram de forma clara o perfil de casos notificados de LTA e LV no período de 10 anos entre 2009 a 2018 e permitem localizar geograficamente as áreas de maior prioridade para ações de vigilância epidemiológica no estado de Pernambuco.

## Referências

- ARAUJO, A. C. et al. Epidemiological aspects and risk factors for infection by *Leishmania infantum* chagasi in dogs from municipality of Petrolina, Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 3–4, p. 41–48, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.07.001>>.
- ARAUJO, A. R. et al. Risk factors associated with american cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, 2016.
- BEZERRA, J. M. T. et al. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. 1–19, 2018.
- BI, K. et al. Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–18, 2018.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing leishmaniasis in north-east Brazil burden of cutaneous. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 488–494, 1999.
- BRASIL. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. 2a ed. Brasília: [s.n.], 2017.
- BRASIL. **Guia de vigilância em saúde**. 3a ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços., 2019.
- BRASIL. **Informações de Saúde (TABNET): epidemiológicas e morbidade**. Ministério da Saude. DATASUS, 2020.

CARDIM, M. F. M. et al. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011. **Revista de Saude Publica**, v. 47, n. 4, p. 691–700, 2013.

CARDIM et al. Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: Spatial and space-time analysis. **Revista de Saude Publica**, v. 50, p. 1–11, 2016.

CARDOSO, D. T. et al. Identification of priority areas for surveillance of cutaneous leishmaniasis using spatial analysis approaches in Southeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2019.

CAVALCANTE, F. R. A. et al. Human visceral leishmaniasis: Epidemiological, temporal and spacial aspects in Northeast Brazil, 2003-2017. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 62, n. July 2019, p. 1–10, 2020.

CERBINO NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: An ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 25, n. 7, p. 1543–1551, 2009.

DANTAS-TORRES, F. et al. Sand fly population dynamics and cutaneous leishmaniasis among soldiers in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–14, 2017.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352–356, 2006.

FONTOURA, I. G.; FONTOURA, V. M.; NASCIMENTO, L. F. C. Análise espacial da ocorrência de leishmaniose visceral no estado do Tocantins, Brasil. **Revista Ambiente e Agua**, v. 9, n. 3, p. 445–458, 2016.

FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n. 1, p. 15–24, 2010.

FURTADO, A. S. et al. Space-time analysis of visceral leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 20, n. 12, p. 3935–3942, 2015.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. Da C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

GUEDES, D. R. D. et al. Patient-based dengue virus surveillance in aedes aegypti from Recife, Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 47, n. 2, p. 67–75, 2010.

GUEDES, D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito Culex quinquefasciatus in Brazil. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 8, 2017.

IBGE. **Relatório IBGE, Diretoria de Pesquisas (DPE), Coordenação de População e Indicadores Sociais (COPIS)**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 2011, n. D, p. 2011, 2018.

JIRMANUS, L. et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of Leishmania (viannia) braziliensis transmission over a 20-

year period. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 426–433, 2012.

KAWA, H. et al. A produção do lugar de transmissão da leishmaniose tegumentar: o caso da Localidade Pau da Fome na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 8, p. 1495–1507, 2010.

LIMA, E. C. B. De et al. Characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in visceral leishmaniasis associated with hiv co-infection in Northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, p. 3–7, 2017.

LINDOSO, J. A. L. et al. Leishmaniasis–HIV coinfection: Current challenges. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 8, p. 147–156, 2016.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Exploring Spatial and Temporal Distribution of Cutaneous Leishmaniasis in the Americas, 2001–2011. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. 2001–2011, 2016.

NASCIMENTO, É. S.; MAIA-HERZOG, M.; SABROZA, P. C. O acesso público da informação em saúde para as doenças negligenciadas no Brasil. **Reciis**, v. 6, n. 2, 2012. Disponível em: <doi:10.3395/reciis.v6i2.568pt>.

PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas No 7 - Março, 2019. **Informe de Leishmanioses No 7**, v. 1, p. 1–27, 2019.

PAHO. **Plan of action to strengthen the surveillance and control of leishmaniasis in the americas 2017-2022**. PAHO - Communicable Diseases and Health Analysis Department, 2017.

PEDROSA, F. D. A.; XIMENES, R. A. De A. Sociodemographic and Environmental Risk Factors for American Cutaneous Leishmaniasis ( ACL ) in the State of Alagoas , Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 81, n. 2, p. 195–201, 2009.

PESSOA-E-SILVA, R. et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, v. 199, n. February, p. 9–16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.02.012>.

RUIZ-POSTIGO, J. A.; GROUT, L.; JAIN, S. Global leishmaniasis surveillance, 2017-2018, and first report on 5 additional indicators. **World Health Organization, Weekly epidemiological record**, n. 25, p. 265–280, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>.

SALIMI, M. et al. Spatio-temporal distribution analysis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Qom Province, Iran. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 42, n. 4, p. 570–576, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12639-018-1036-5>.

SAUDE, M. Da. **Introdução a estatística espacial para a saúde pública**. [S.l.]: Secretaria de Vigilância em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz., 2007.

SILVA, O. A.; BRAGA, G. M. Da S. Leishmaniose visceral canina no município de São Vicente Férrer , Estado de Pernambuco , Brasil Canine visceral leishmaniasis at the urban area of the Municipality of São Vicente Férrer in the State of Pernambuco , Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 101–102, 2008.

SOARES, V. B. et al. Epidemiological surveillance of tegumentary leishmaniasis: local territorial analysis. **Revista de saude publica**, v. 51, p. 51, 2017.

VEIGA GONÇALVES, N. et al. Cutaneous leishmaniasis: Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará, Brazilian Eastern Amazon. **Journal of infection in developing countries**, v. 13, n. 10, p. 939–944, 2019.

WERNECK, G. L. The control of visceral leishmaniasis in Brazil: end of a cycle? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, p. 1–2, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2016000600201&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2016000600201&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>.

## 6 CONCLUSÕES

- No município de Timbaúba/PE, no período do estudo, permanecem como características da LTA a predominância de casos em pessoas adultas e em trabalhadores rurais;
- A transmissão da LTA em Timbaúba/PE ocorre em áreas próximas a fragmentos de Mata Atlântica;
- *Nyssomyia whitmani* é o vetor responsável pela transmissão da *Leishmania braziliensis* no município de Timbaúba/PE;
- A incidência linear da LV evidencia um crescimento preocupante do agravo no Estado de Pernambuco;
- A taxa de letalidade da leishmaniose visceral está diminuindo em Pernambuco;
- Os casos de leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco apresentaram diminuição da incidência nos últimos anos;
- Em Pernambuco as áreas de maior prioridade para a leishmaniose visceral estão no Sertão do estado;
- Para a leishmaniose tegumentar americana as áreas de maior prioridade estão na mesorregião da Mata;
- Os resultados demonstram a importância da vigilância epidemiológica associada com a análise por geoprocessamento.

## 7 REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, 2017.
- ALI, S. A.; AHMAD, A. Spatial susceptibility analysis of vector-borne diseases in KMC using geospatial technique and MCDM approach. **Modeling Earth Systems and Environment**, v. 5, n. 3, p. 1135–1159, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40808-019-00586-y>>.
- ANDRADE, I.; SANTANA, G. M. S.; SACRAMENTO, R. V. O. Geoprocessamento em saúde: um estudo sobre a leishmaniose tegumentar americana no Vale do Jiquiriçá, Bahia, Brasil. **Hygeia**, v. 10, n. 18, 2014.
- ANTUNES, J. L. F.; CARDOSO, M. R. A. Uso da análise de séries temporais em estudos epidemiológicos. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 3, p. 565–576, 2015.
- ARAUJO, A. C. et al. Epidemiological aspects and risk factors for infection by *Leishmania infantum* chagasi in dogs from municipality of Petrolina, Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. v. 3–4, p. 41–48, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.07.001>>.
- ARAUJO, A. R. et al. Risk factors associated with american cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**. v. 58, 2016.
- ARENAS, R. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**. v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.
- ASSUNÇÃO, R. M. et al. Mapas de taxas epidemiológicas: uma abordagem Bayesiana. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 14, n. 4, p. 713–723, 1998.
- BARCELLOS, C.; BASTOS, F. I. Geoprocessamento, ambiente e saúde: uma união possível? **Cadernos de Saúde Pública**. v. 12, n. 3, 1996.
- BEZERRA, J. M. T. et al. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990–2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 12, n. 9, p. 1–19, 2018.
- BI, K. et al. Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. **BioMed Research International**. v. 2018, p. 1–18, 2018.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing leishmaniasis in north-east Brazil burden of cutaneous. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 93, p. 488–494, 1999.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1a ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. 2a ed. Brasília: [s.n.], 2017.

BRASIL. **Guia de vigilância em saúde**. 3a ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços., 2019.

BRASIL. **Informações de Saúde (TABNET): epidemiológicas e morbidade**. Ministério da Saúde. DATASUS, 2020.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, p. 257–274, 2003.

BRILHANTE, A. F. et al. Canine cutaneous leishmaniasis by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in an agricultural settlement, endemic area for leishmaniasis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 68, n. 4, p. 927–930, 2016.

BRITO, M. E. F. et al. 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. 1278–1286, 2009.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 45, n. 4, p. 425-429, 2012.

BRUNO, B. et al. Serum indirect immunofluorescence assay and real-time PCR results in dogs affected by *Leishmania infantum*: evaluation before and after treatment at different clinical stages. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 31, n. 2, p. 222–227, 2019.

CARDIM, M. F. M. et al. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011. **Revista de Saude Publica**. v. 47, n. 4, p. 691–700, 2013.

CARDIM et al. Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: Spatial and space-time analysis. **Revista de Saude Publica**. v. 50, p. 1–11, 2016.

CARDOSO, D. T. et al. Identification of priority areas for surveillance of cutaneous leishmaniasis using spatial analysis approaches in Southeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**. v. 19, n. 1, p. 1–11, 2019.

CARDOSO, M. S. et al. Detection of multiple circulating *Leishmania* species in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Governador Valadares, southeastern Brazil. **PLoS ONE**. v. 14, n. 2, p. 1–16, 2019.

CARRO, K. B. D. et al. Assessing geographic and climatic variables to predict the potential distribution of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* in the state of Espírito Santo, Brazil. **PLoS ONE**. n. VI, p. 1–14, 2020.

- CASARIL, A. E. et al. Standardization of DNA extraction from sand flies: Application to genotyping by next generation sequencing. **Experimental Parasitology**. v. 177, p. 66–72, 2017.
- CAVALCANTE, F. R. A. et al. Human visceral leishmaniasis: Epidemiological, temporal and spacial aspects in Northeast Brazil, 2003-2017. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**. v. 62, n. July 2019, p. 1–10, 2020.
- CERBINO NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: An ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cadernos de Saude Publica**. v. 25, n. 7, p. 1543–1551, 2009.
- CURTI, M. C. M. et al. Epidemiological and clinical characteristics of cutaneous leishmaniasis and their relationship with the laboratory data , south of Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 15, n. 1, p. 12–16, 2011.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Sand fly population dynamics and cutaneous leishmaniasis among soldiers in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n. 2, p. 1–14, 2017.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 4, p. 352–356, 2006.
- DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. **Journal of Bacteriology & Parasitology**. v. 04, n. 02, 2013.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**. v. 27, n. 5, p. 305–18, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225981>>. Acesso em: 14 jul. 2014.
- DETONI, M. B. et al. Temporal and spatial distribution of american tegumentary leishmaniasis in North Paraná: 2010-2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 52, p. 1–6, 2019.
- FONTOURA, I. G.; FONTOURA, V. M.; NASCIMENTO, L. F. C. Análise espacial da ocorrência de leishmaniose visceral no estado do Tocantins, Brasil. **Revista Ambiente e Agua**. v. 9, n. 3, p. 445–458, 2016.
- FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 19, n. 1, p. 15–24, 2010.
- FURTADO, A. S. et al. Space-time analysis of visceral leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil. **Ciencia e Saude Coletiva**. v. 20, n. 12, p. 3935–3942, 2015.
- GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae e Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 2014.
- GUEDES, D. R. D. et al. Patient-based dengue virus surveillance in aedes aegypti from Recife, Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases**. v. 47, n. 2, p. 67–75, 2010.

GUEDES, D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes and Infections**. v. 6, n. 8, 2017.

GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**. v. 56, n. 4, p. 357–360, 2014.

GUPTA, P. S.; SONI, M.; GUPTA, A. Neglected Tropical Diseases: Current Snapshot. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 5, n. 2, p. 615–626, 2016.

IBGE. **Relatório IBGE, Diretoria de Pesquisas (DPE), Coordenação de População e Indicadores Sociais (COPIS)**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. v. 2011, n. D, p. 2011.

JIRMANUS, L. et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 86, n. 3, p. 426–433, 2012.

KAWA, H. et al. A produção do lugar de transmissão da leishmaniose tegumentar: o caso da Localidade Pau da Fome na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 26, n. 8, p. 1495–1507, 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>>.

LABOUDI, M. et al. A review of cutaneous leishmaniasis in Morocco: A vertical analysis to determine appropriate interventions for control and prevention. **Acta Tropica**. v. 187, p. 275–283, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.07.019>>.

LEVINE, N. D. et al. A Newly Revised Classification of the Protozoa. **The Journal of Protozoology**. v. 27, n. 1, p. 37–58, 1980.

LIMA, B. S. et al. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. In a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 107, n. 9, p. 592–597, 2013.

LIMA, E. C. B. De et al. Characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in visceral leishmaniasis associated with hiv co-infection in Northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**. v. 59, p. 3–7, 2017.

LINDOSO, J. A. L. et al. Leishmaniasis–HIV coinfection: Current challenges. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**. v. 8, p. 147–156, 2016.

MAGALHAES, T. et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n. 11, p. 1–25, 2017.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: Trends and challenges. **Cadernos de Saude Publica**. v. 24, n. 12, p. 2941–2947, 2008.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Exploring Spatial and Temporal Distribution of Cutaneous Leishmaniasis in the Americas, 2001–2011. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 10, n. 11, p. 2001–2011, 2016.

MICHALSKY, É. M. et al. Infecção natural de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 44, n. 1, p. 58–62, 2011.

MIRANDA, D. E. De O. et al. Ecology of sand flies in a low-density residential rural area, with mixed forest/agricultural exploitation, in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**. v. 146, p. 89–94, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.011>>.

MIRANDA, T. M. De et al. Descriptive study of American tegumentary leishmaniasis in the urban area of the Municipality of Governador Valadares, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 2, n. 1, p. 27–35, 2011.

MOEMENBELLAH-FARD, M. D. et al. Faunal identification and frequency distribution of wild sand flies infected with *Leishmania tropica*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 5, n. 10, p. 792–797, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60932-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60932-X)>.

NASCIMENTO, É. S.; MAIA-HERZOG, M.; SABROZA, P. C. O acesso público da informação em saúde para as doenças negligenciadas no Brasil. **Reciis**. v. 6, n. 2, 2012. Disponível em: <[doi:10.3395/reciis.v6i2.568pt](https://doi.org/10.3395/reciis.v6i2.568pt)>.

NAZRI, C. D.; RODZIAH, I.; HASHIM, A. Distribution pattern of a dengue fever outbreak using GIS. **Journal of Environmental Health**. v. 71, n. 5, 2008.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N. et al. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 6, p. 540–543, 2006.

PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas No 7 - Março, 2019. **Informe de Leishmanioses**. n. 7. v. 1, p. 1–27, 2019.

PAHO. **Plan of action to strengthen the surveillance and control of leishmaniasis in the Americas 2017-2022**. PAHO - Communicable Diseases and Health Analysis Department, 2017.

PAIVA CAVALCANTI, M. et al. 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. 122–128. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2013.01.003>>.

PEDROSA, F. D. A.; XIMENES, R. A. A. Sociodemographic and Environmental Risk Factors for American Cutaneous Leishmaniasis ( ACL ) in the State of Alagoas , Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 81, n. 2, p. 195–201, 2009.

PEREIRA JÚNIOR, A. M. et al. Ecological aspects and molecular detection of *Leishmania* DNA Ross (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in phlebotomine sandflies

(Diptera: Psychodidae) in terra firme and várzea environments in the Middle Solimões Region, Amazonas State, Brazil. **Parasites and Vectors**. v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015.

PEREIRA JÚNIOR, A. M. et al. Diversity, natural infection and blood meal sources of phlebotomine sandflies (Diptera, psychodidae) in the western Brazilian amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 114, n. 6, p. 1–9, 2019.

PESSOA-E-SILVA, R. et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**. v. 199, n. February, p. 9–16, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.02.012>>.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário Leishmania com seus vetores. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT**. [S.l.]: INCT/EM, p. 1–45, 2012.

PIRAJÁ, G.; LUCHEIS, S. A Vigilância Epidemiológica De Flebotomíneos Como Planejamento E Ações De Controle Nas Leishmanioses. **Veterinária e Zootecnia**. v. 21, n. 4, p. 503–515, 2014.

RAMEZANKHANI, R. et al. Spatial analysis of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Iran based on environmental factors. **Geospatial Health**. v. 12, n. 2, p. 282–293, 2017.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: Aspects of their biology and vectorial competence. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 7, p. 937–954, 2009.

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**. v. 58, n. 1, p. 227–250, 2013.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**. v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RÍOS, J. M.; YUIL DE RÍOS, E. Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, 1958 histopatológicos y moleculares de leishmaniasis cutânea. **Rev. Méd. Cient**. v. 23, n. 2, p. 22–27, 2011.

ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**. v. 430, n. 6998, p. 463–467, 2004.

ROMERO, G. A. S. et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n. 6, p. e0005706, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005706>>.

RUIZ-POSTIGO, J. A.; GROUT, L.; JAIN, S. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **World Health Organization, Weekly epidemiological record**. n. 25, p. 265–280, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>>.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**. v. 55, p. 453–83, 2001.

SALES, K. G. D. S. et al. Home sweet home: Sand flies find a refuge in remote indigenous villages in north-eastern Brazil, where leishmaniasis is endemic. **Parasites and Vectors**. v. 12, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3383-1>>.

SALIMI, M. et al. Spatio-temporal distribution analysis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Qom Province, Iran. **Journal of Parasitic Diseases**. v. 42, n. 4, p. 570–576, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12639-018-1036-5>>.

SANTOS, D. R. et al. Observações sobre a atividade diurna de Nyssomyia whitmani (Diptera: Psychodidae) na área urbana de Maringá, Paraná, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 18, n. 3, p. 227–236, 2009.

SAUDE, M. **Introdução a estatística espacial para a saúde pública**. [S.l.]: Secretaria de Vigilância em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz., 2007.

SILVA, C. M. H. S.; WINCK, C. A. Leishmaniose Visceral Canina: Revisão de literatura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v. 23, n. 18, p. 125–128, 2018.

SILVA, D. F.; VASCONCELOS, S. D. Flebotomíneo em fragmentos de Mata Atlântica na Região Metropolitana do Recife, PE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, n. 3, p. 264–266, 2005.

SILVA, J. A. O. et al. Sandflies in an endemic area for visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 28, n. 4, p. 569–573, 2019.

SILVA, O. A.; BRAGA, G. M. S. Leishmaniose visceral canina no município de São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco, Brasil Canine visceral leishmaniasis at the urban area of the Municipality of São Vicente Férrer in the State of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v. 15, n. 2, p. 101–102, 2008.

SOARES, D. C.; GARCEZ, L. M.; NETO, H. F. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Juruti, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 1, n. 1, 2010.

SOARES, M. R. A. et al. Molecular analysis of natural infection of lutzomyia longipalpis in an endemic area for visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saude Publica**. v. 26, n. 12, p. 2409–2413, 2010.

SOARES, V. B. et al. Epidemiological surveillance of tegumentary leishmaniasis: local territorial analysis. **Revista de saude publica**. v. 51, p. 51, 2017.

SZARGIKI, R. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 13, n. 1, p. 47–52, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-86702009000100011&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702009000100011&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

TALBI, F. Z. et al. Thematic Maps of the Impact of Urbanization and Socioeconomic Factors on the Distribution of the Incidence of Cutaneous Leishmaniasis Cases in Sefrou Province, Central North of Morocco ( 2007 – 2011). **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. 2020.

TALMI-FRANK, D. et al. Detection and identification of old world Leishmania by high resolution melt analysis. **PLoS neglected tropical diseases**. v. 4, n. 1, p. e581, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2797090&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

VEIGA GONÇALVES, N. et al. Cutaneous leishmaniasis: Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará, Brazilian Eastern Amazon. **Journal of infection in developing countries**. v. 13, n. 10, p. 939–944, 2019.

VILLARREAL, M. R. Life cycle of the parasites from the genus Leishmania, the cause of the disease Leishmaniasis. Wikimedia, 2020.

VOLF, P. et al. Blocked stomodeal valve of the insect vector: Similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. **International Journal for Parasitology**. v. 34, n. 11, p. 1221–1227, 2004.

VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**. v. 36, n. SUPPL.1, p. 1–9, 2011.

VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**. v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

WERNECK, G. L. The control of visceral leishmaniasis in Brazil: end of a cycle? **Cadernos de Saúde Pública**. v. 32, n. 6, p. 1–2, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2016000600201&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2016000600201&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>.

WHO. **Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2018**. World Health Organisation. 2018a. Disponível em: <[https://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html](https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html)>.

WHO. **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2018**. Control of Neglected Tropical Diseases (NTD), World Health Organization. 2018b.

WHO. **Visceral leishmaniasis**. 2020. Disponível em: <[https://www.who.int/leishmaniasis/visceral\\_leishmaniasis/en/](https://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/)>.

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)**. Gainesville: Associate Publishers, 1994.

ZAIDAN, R. T. Geoprocessamento Conceitos E Definições. **Revista de Geografia - PPGeo - UFJF**, v. 7, n. 2, 2017.

## ANEXO A – SUBMISSÃO ARTIGO 1

Revista: Hygeia - Qualis: B1

### **RISK MAP OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN A RURAL AREA: HUMAN CASES AND PHLEBOTOMINE ECOLOGY IN NORTHEASTERN BRAZIL.**

ALBERON RIBEIRO ARAÚJO<sup>1,2</sup>, WALTER BERNHARD HEINRICH EBBERS II<sup>3</sup>; ANA PAULA SAMPAIO FEITOSA<sup>1,4</sup>; DANILLO ABREU DA SILVA<sup>5</sup>; RAFAELLA DE ARAÚJO MONTEIRO BANDEIRA<sup>5</sup>; CLAUDIA MARÍA RÍOS VELÁSQUEZ<sup>6</sup>, FELIPE ARLEY COSTA PESSOA<sup>6</sup>, LUIZ CARLOS ALVES<sup>1,4</sup>; FABIO ANDRÉ BRAYNER<sup>1,2,4</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Departamento de Parasitologia, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: [alberon@cpqam.fiocruz.br](mailto:alberon@cpqam.fiocruz.br), +558121012692;

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>4</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>5</sup>Secretaria de Saúde de Timbaúba, Município de Timbaúba, Pernambuco, Brasil.

<sup>6</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMDFIOCRUZ, Laboratório em Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia, Manaus – AM.

[Hygeia] Agradecimento pela submissão » Caixa de entrada x



Flávia de Oliveira Santos <[sistemasjava@cti.ufu.br](mailto:sistemasjava@cti.ufu.br)>

03:43 (há 10 horas)



para mim ▼

Alberon Araujo,

Agradecemos a submissão do trabalho "MAPA DE RISCO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM UMA ÁREA RURAL: CASOS HUMANOS E ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS NO NORDESTE DO BRASIL." para a revista Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde. Acompanhe o progresso da sua submissão por meio da interface de administração do sistema, disponível em:

URL da submissão: <http://www.seer.ufu.br/index.php/hygeia/authorDashboard/submission/57942>

Login: alberon

Em caso de dúvidas, entre em contato via e-mail.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de compartilhar seu trabalho.

Flávia de Oliveira Santos

## ANEXO B - SUBMISSÃO ARTIGO 2

Revista: Hygeia - Qualis: B1

### **Spatio-temporal analysis of visceral and tegumentary leishmaniasis in Pernambuco, Brazil – 2009 to 2018.**

ALBERON RIBEIRO ARAÚJO<sup>1,2</sup>; ANA PAULA SAMPAIO FEITOSA<sup>1,3</sup>; DANILO ABREU DA SILVA<sup>4</sup>; RAFAELLA DE ARAÚJO MONTEIRO BANDEIRA<sup>4</sup>; LUIZ CARLOS ALVES<sup>1,3</sup>; FABIO ANDRÉ BRAYNER<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Departamento de Parasitologia, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: [alberon@cpqam.fiocruz.br](mailto:alberon@cpqam.fiocruz.br), +558121012692;

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>3</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Secretaria de Saúde de Timbaúba, Município de Timbaúba, Pernambuco, Brasil.

[Hygeia] Agradecimento pela submissão Caixa de entrada x



Flávia de Oliveira Santos <[sistemasjava@cti.ufu.br](mailto:sistemasjava@cti.ufu.br)>  
para mim ▾

05:04 (há 9 horas) ☆ ↶

Alberon Araujo,

Agradecemos a submissão do trabalho "Análise espaço-temporal de casos de leishmanioses visceral e tegumentar em Pernambuco, Brasil – 2009 a 2018." para a revista Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde.

Acompanhe o progresso da sua submissão por meio da interface de administração do sistema, disponível em:

URL da submissão: <http://www.seer.ufu.br/index.php/hygeia/authorDashboard/submission/57943>



Login: alberon

Em caso de dúvidas, entre em contato via e-mail.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de compartilhar seu trabalho.

Flávia de Oliveira Santos

## ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



**Título do Projeto:** "Caracterização da Leishmaniose Tegumentar Americana nas áreas endêmicas do município de Timbaúba/PE: aspectos clínicos, epidemiológicos, imunológicos, tratamento celular in vitro com novas drogas e dinâmica dos flebotomíneos".

**Pesquisador responsável:** Luiz Carlos Alves

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 24/08/2016

**Registro no CAAE:** 59093316.0.0000.5190

**Número do Parecer PlatBr:** 1.908.594

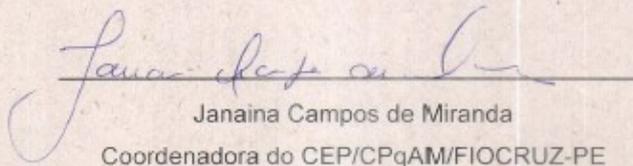
### PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

O CEP/CPqAM reforça a necessidade de entrega de relatórios parcial e final, em cumprimento a resolução 466/12, capítulo XI, artigo 2d.

Recife, 06 de fevereiro de 2017.

  
Janaina Campos de Miranda  
Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Câmpus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n  
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639  
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639  
Recife - PE - Brasil  
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

Janaina Campos de Miranda  
Pesquisadora em Saúde Pública  
Coordenadora  
Nº. SIAPE 464177  
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

