



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DE *LEISHMANIA* SPP. EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO ESTADO DE RORAIMA

JOSENEIDE VIANA DE ALMEIDA

Orientador: Professor Doutor Reginaldo Peçanha Brazil

2020



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JOSENEIDE VIANA DE ALMEIDA

DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DE *LEISHMANIA* SPP. EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO ESTADO DE RORAIMA

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Biologia Parasitária, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Professor Doutor Reginaldo Peçanha Brazil

2020

Viana de Almeida, Joseneide.

Diagnóstico e caracterização de *Leishmania spp* em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar no estado de Roraima / Joseneide Viana de Almeida. - Rio de Janeiro, 2020.
107 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: Reginaldo Peçanha Brazil.

Bibliografia: f. 01-107

1. leishmaniose. 2. Leishmania. 3. PCR. 4. Roraima. I. Título.



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: JOSENEIDE VIANA DE ALMEIDA

DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DE *LEISHMANIA* SPP. EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO ESTADO DE RORAIMA

ORIENTADOR : Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Aprovada em: 09/10/2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Alda Maria da Cruz - Presidente (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr^a. Patricia Quaresma (UFSC)

Prof. Dr^a. Carolina Spiegel (UFF)

Prof. Dr^a. Célia Maria Ferreira Gontijo(IPqRR/FIOCRUZ/Suplente)

Prof. Dr. José Dilermando A. Filho (IPqRR/Suplente)

Rio de Janeiro, 09 de outubro de 2020

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Joseneide Viana de Almeida**, sob orientação do Dr. Reginaldo Peçanha Brazil. Ao nono dia do mês de outubro de dois mil e vinte, realizou-se às dez horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado intitulada: **"Diagnóstico e caracterização de Leishmania spp. em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose cutânea no estado de Roraima"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Estudos Bioquímicos e Moleculares de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Alda Maria da Cruz – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Carolina Nascimento Spiegel– UFF/RJ, Dr^a. Patricia Flávia Quaresma – UFSC/SC e como suplentes: Dr. José Dilermando Andrade Filho- IRR/FIOCRUZ e Dr^a. Celia Maria Ferreira Gontijo - IRR/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 09 de outubro de 2020.

Dr^a. Alda Maria da Cruz (Presidente da Banca):



Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):



DEDICATÓRIA

À memória de Martinez Tavares de Almeida que nos deixou com sabedoria para traçarmos esta caminhada.

Àqueles que demonstraram dedicação e disponibilizaram alguns momentos de suas vidas contribuindo com informações necessárias para que este trabalho fosse realizado.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus eterno, pela preciosa dádiva de nos permitir o dom de disseminar e dar sentidos aos mais diversos conhecimentos da natureza humana.

Aos meus pais, especialmente minha mãe Joana Viana de Almeida e Martinez tavares de Almeida (em memória), por cada passo da minha trajetória na vida.

Ao Orientador Dr. Reginaldo Peçanha Brazil, pela dedicação e pelo esmero com que estilizou os textos apresentados na produção deste trabalho.

Ao Dr. Cristian Ferreira de Souza pela cumplicidade, companheirismo e dedicação, pessoa abençoada que Deus colocou no meu caminho.

A professora Enfermeira Mestre Eliene Mendes de Oliveira da Faculdade Roraimense de Ensino Superior, pessoa amiga, que contribuiu em muito nas opiniões dos textos produzidos, segurou a barra da coordenação do curso de enfermagem da IES enquanto eu me dedicava no doutorado e na pesquisa propriamente dita, uma mulher de muita fé.

Aos pacientes e nossos colaboradores dos Municípios de coleta: Enfermeiro Francisco Moisés e sua equipe do município de Caroebe, Enfermeiro Antonio Marques do município de Pacaraima, Técnico em Laboratório Francisco das Chagas Pereira Oliveira do posto de saúde do Mecajena do Município de Boa Vista, Técnico em Laboratório Miguel Pereira da Costa do centro de Saúde I Edite Cardoso do Município de Mucajaí, Arleane Pereira dos Santos Enfermeira e técnica de laboratório da Casai em Boa Vista.

À minha esposa Priscila Roland Costa Almeida e meus filhos Jônatas, Gênefer, Martins e Davi, alicerces indispensáveis, pelo amor, acolhida e compreensão nos momentos roubados de nosso convívio.

Aos nossos familiares pela inspiração, ap, oio, dedicação e paciência em todos os momentos difíceis e de fraqueza, tornando-se para nós o melhor de todas as nossas conquistas.

À CAPES, UFRR e IOC, pela aprovação do Projeto de Doutorado Interinstitucional (DINTER) com o Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Biologia Parasitária (PGBP) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Instituição Promotora, que viabilizou a realização a realização do curso.



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diagnóstico e caracterização de *Leishmania* spp. em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose cutânea no estado de Roraima

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Joseneide Viana de Almeida

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença endêmica no Brasil, sendo a região Norte responsável pelo maior número de casos no país. Nesse contexto, destaca-se o contínuo e crescente número de casos registrados no SINAN no estado de Roraima em humanos, sem registro efetivamente de estudos que identificasse as espécies de *Leishmania* que acometem a população. O presente estudo se propôs a caracterizar as espécies de *Leishmania* circulantes entre humanos em amostras isoladas de pacientes com leishmaniose cutânea em áreas endêmicas do Estado de Roraima no período de 2016 a 2018. Foram coletadas 262 amostras de pacientes com suspeita clínica de LT e submetidas ao exame parasitológico direto (PDL) e caracterização molecular por PCR, utilizando iniciadores para os alvos kDNA, ITS-1. 81,6% pertenciam a pacientes do sexo masculino. A apresentação clínica cutânea predominante foi a presença de uma única lesão (80,3%). Das 262 amostras, foram selecionadas 76 amostras positivas nas PCR-ITS-1 e PCR-kDNA, cujo sequenciamento gênico possibilitou a caracterização de oito espécies diferentes: *L. (Viannia) braziliensis* (30,3%), *L. (L.) amazonensis* (18,4%), *L.(V) guyanensis* (5,3%), *L. (V) naiffi* (1,3%), *L.(V) shawi* (1,3%), *L.(V) panamensis* (13,2%), *L. (V) utingensis* (1,3%), *L.(V) lindenbergi* (1,3%), entretanto, 25% das amostras apresentaram perfis de *Leishmania* sp, não sendo possível a identificação das espécies. Epidemiologicamente, este estudo é pioneiro em revelar as espécies de *Leishmania* circulantes em Roraima em humanos. Além das *Leishmania* já identificadas no Brasil, nós caracterizamos duas espécies novas, *L. panamensis*

e a *L. (V) utingensis*, o que ressalta a importância da investigação sistemática dos isolados para que possamos conhecer o real etiologia dos casos de LT no país.

Palavra chave: leishmaniose, *Leishmania*, PCR, Roraima.



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diagnosis and characterization of *Leishmania* spp. in clinical samples from patients with cutaneous leishmaniasis in the state of Roraima

ABSTRACT

PhD THESIS IN PARASITARY BIOLOGY

Joseneide Viana de Almeida

Cutaneous leishmaniasis (CL) is an endemic disease in Brazil, being the northern region responsible for the largest number of cases in the country. In this context, we highlight the continuous and growing number of cases registered in SINAN in the state of Roraima in humans, with no effective record of studies that identified the species of *Leishmanias* that affect the population. The present study aimed to characterize the species of *Leishmania* spp. circulating among humans in isolated samples from patients with cutaneous leishmaniasis in endemic areas of the State of Roraima in the period from 2016 to 2018. 262 samples were collected from patients with clinical suspicion of CL and subjected to direct parasitological examination (PDL) and molecular characterization by PCR using primers for the kDNA, ITS-1 targets. 81.58% belonged to male patients. The cutaneous clinical form was predominant in a single lesion (80.26%). Of the 262 samples, 76 positive samples were selected in PCR-ITS-1 and PCR-kDNA, which through sequencing, were able to characterize eight different species: *L. (V) braziliensis* (30.27%), *L. (L) amazonensis* (18.42%), *L. (V) guyanensis* (5.25%), *L. (V) naiffi* (1.31%), *L. (V) shawi* (1.31%), *L.(V)panamensis* (13.17%), *L.(V) utingensis* (1.31%), *L. (V)lindenbergi* (1.31%) and 25% of the samples presented profiles of *Leishmania* sp. Epidemiologically, the study is a pioneer in revealing the species of leishmanias circulating in Roraima by molecular biology in humans, and thus, further investigations on vectors, hosts, the incidence of the disease, the etiological agents, as well as intensification of surveillance and control of CL in the state.

Key word: Leishmaniasis, *Leishmania*, PCR, Roraima

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. CONTEXTO TEÓRICO DA INVESTIGAÇÃO | 3 |
| 2.1. Leishmanioses | 3 |
| 2.2. Agentes etiológicos das leishmanioses | 4 |
| 2.3. Ciclo Biológico e agentes etiológicos da <i>Leishmania</i> | 7 |
| 2.4. Vetores na transmissão da LTA | 8 |
| 2.5. Reservatórios e hospedeiros na transmissão da <i>Leishmania</i> spp. | 10 |
| 2.6. Epidemiologia das Leishmanioses | 11 |
| 2.6. Diagnóstico e Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana | 13 |
| 2.6.1. Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar | 13 |
| 2.6.2. Diagnóstico Laboratorial | 14 |
| 2.6.3 Diagnóstico molecular | 15 |
| 2.7. Justificativa | 15 |
| 3. OBJETIVOS | 16 |
| 3.1. Objetivo Geral | 16 |
| 3.2. Objetivos específicos | 16 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 17 |
| 4.1. Desenho do estudo | 17 |
| 4.2. Caracterização da área de estudo | 17 |
| 4.3. Coleta de material biológico de indivíduos com suspeita clínica de LT ... | 19 |
| 4.4. Diagnóstico clínico, parasitológico e molecular | 21 |
| 4.4.1. Exame Clínico | 21 |
| 4.4.2. Diagnóstico Parasitológico direto | 21 |
| 4.4.3. Diagnóstico molecular | 21 |
| 4.4.3.1. Obtenção de extrato total do papel de filtro | 21 |
| 4.4.3.2. Extração de DNA | 21 |
| 4.4.3.3. PCR para detectar DNA de <i>Leishmania</i> spp. nas amostras coletadas. | 22 |
| 4.4.3.4. Sequenciamento | 25 |
| 4.4.3.5. Análise discriminante de componentes principais e análise filogenética | 26 |
| 5. Análise Estatística | 26 |
| 6. RESULTADOS | 27 |
| 7. DISCUSSÃO | 63 |
| 8. COCLUSÕES | 69 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 70 |

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

SIGLA - DESCRIÇÃO

- LT – Leishmaniose Tegumentar
- SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
- PDL – Exame Parasitológico Direto
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention
- DNA - Deoxyribonucleic Acid
- ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
- FUNASA - Fundação Nacional da Saúde
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IOC - Instituto Oswaldo Cruz
- ITS1 - Internal Transcribed Spacer 1
- LV - Leishmaniose Visceral
- LM – Leishmaniose Mucosa
- LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada
- PKDL – Leishmaniose Dérmica Pós Calazar
- MS - Ministério da Saúde
- PCR - Polymerase Chain Reaction
- WHO - World Health Organization
- AM – Amazonas
- RR – Roraima
- OPAS – Organização Panamericana da Saúde
- SUS – Sistema Único de Saúde
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- IDRM – Intradermorreação de Montenegro
- CASAI – Casa de Saúde Indígena de Roraima
- CIR – Conselho Indígena de Roraima
- SEDEX - Serviço de Encomenda Expressa Nacional

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Iniciadores utilizados nas reações de PCR com suas respectivas sequências e tamanhos de produtos amplificados. | 25 |
|--|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp. Fonte: adaptado de CDC (2018). | 8 |
| Figura 2 – Distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetoras da leishmaniose cutânea no Brasil, 2015..... | 9 |
| Figura 3 - Ciclo de transmissão das leishmanioses no Brasil..... | 9 |
| Figura 4 - Status de endemidade de leishmaniose cutânea no mundo, dados de 2016. | 11 |
| Figura 5 - Status de endemidade de leishmaniose visceral no mundo, dados de 2018 - Fonte: adaptado de WHO (2020)..... | 12 |
| Figura 6 - Mapa da América do Sul, representando o bioma Amazônia, países da Amazônia Internacional, Amazônia Brasileira/Legal, Estados Brasileiros da região norte do Brasil na Amazônia Legal..... | 13 |
| Figura 7 – Mapa do Brasil e do estado de Roraima com os 15 municípios e suas áreas de fronteiras em território Brasileiro e Internacional. | 20 |
| Figura 8 – Mapa de Biomas do Brasil e localização geográfica do estado de Roraima e os municípios de coleta de material para este estudo de Leishmaniose Cutânea | 20 |
| Figura 9 – Coleta de amostras de paciente. Imagem A= Foto de lesão característica de Leishmaniose Cutânea em região da face externa do tornozelo esquerdo de um paciente e imagem B, inprint em papel filtro da lesão..... | 22 |
| Figura 10 - Região intergênica do ITS1..... | 24 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|---|
| Quadro 1: Principais espécies de <i>Leishmania</i> dermatrópicas responsáveis pelas leishmanioses nas Américas, sua distribuição geográfica, vetores e formas clínicas. | 6 |
|---|---|

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Cutânea (LC) é conceitualmente definida como uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. Primariamente, é uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente (BRASIL, 2010).

No Sistema Único de Saúde (SUS) as leishmanioses são consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com aspectos clínicos e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL, 2017).

A incidência da LC no Brasil vem aumentando consideravelmente, cerca de 21.000 casos foram notificados em 1998, com o aumento da ocorrência para 40.000 em 2002. Em média, apresenta uma incidência de 35.000 casos/ano e encontra-se distribuída desde o sul da Bacia Amazônica ao sul do país. Tendo os seguintes coeficientes de detecção até o momento dos anos de 2000 (308,2), 2001 (310,9), 2002 (338,2) e 2005 (313,6) (DESJEUX, 2004; FNS, 2002; REBELLO et al., 2010).

No Brasil, uma das formas comuns da doença é a leishmaniose cutânea que ocorre em surtos epidêmicos ligados à derrubada das matas, à exploração desordenada da floresta e às atividades humanas ligadas à agricultura (COSTA, 2005).

Na Região Amazônica, sete espécies de *Leishmania* são responsáveis pelos casos de LC, sendo a *Leishmania (Viannia) braziliensis* a que apresenta o maior potencial patogênico ao homem e está relacionada não só com a infecção cutânea, mas também, com a forma clínica mais grave, de longa evolução, com lesões mucosas destrutivas (LAINSON, 2005; SILVEIRA, 2002; VERGEL, 2006).

Devido à complexa interação entre as espécies de *Leishmania* que atuam como agentes etiológicos na região amazônica, a diversidade de vetores e as diferentes manifestações clínicas da doença no hospedeiro tornam o entendimento da patogenia da LC nessa região um desafio.

A importância de melhor entendimento epidemiológico da leishmaniose tegumentar cutânea consiste não somente no fato de possuir ampla distribuição geográfica no país, mas também devido à constatação de que formas que podem levar á lesões permanentes tendem a acarretar graves comprometimentos psicossociais no indivíduo afetado. Entendê-la globalmente é fundamental para adotar medidas que possam minimizar a sua incidência e, conseqüentemente, o sofrimento daqueles que convivem com essa antroponose (SILVA & MUNIZ, 2009).

Estudos de Rossi *et al.* 2010, sobre a situação epidemiológica da leishmaniose cutânea no Estado de Roraima, analisando dados do SINAN nos anos de 2006 a 2009, afirmam que a leishmaniose cutânea é uma doença com vários focos em Roraima e que acomete principalmente homens na idade adulta com predomínio da forma cutânea da doença. Foi ainda constatado na pesquisa que alguns itens da ficha de notificação não foram preenchidos o que deixa uma falha nos levantamentos epidemiológicos e dificulta a ação preventiva dos órgãos responsáveis pela saúde no estado.

O Estado de Roraima notificou em 2013, 507 casos de leishmaniose cutânea. Desses casos, pouco mais de 58,9% são dos municípios de Rorainópolis (163), São João da Baliza (32), Caroebe (85) e São Luiz (19). Todos localizados na região Sul de Roraima. Na região Norte, o Município de Boa Vista notificou 106 casos. Assim, estes municípios representam 79,8% dos casos notificados de leishmaniose tegumentar no ano de 2013. No ano de 2014 foram notificados 548 casos em todos os municípios, apresentando praticamente a mesma distribuição. No ano de 2015 no meado do mês de setembro o Estado já apresenta 530 casos notificados, demonstrando que a LC está em ascensão ao longo deste triênio. As informações são do Sistema de Nacional de Agravos e Notificações (Sinan/Net).

2. CONTEXTO TEÓRICO DA INVESTIGAÇÃO

2.1. Leishmanioses

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública. São consideradas um complexo de doenças devido às diferenças e peculiaridades de suas características clínicas e epidemiológicas (Brasil, 2010). Classicamente na literatura, distingue-se duas formas de apresentação clínica: a Leishmaniose Cutânea (LC) e a Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o séc. I d.C. Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos aborígenes do Peru, que apresentam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose cutânea-mucosa. Posteriormente, através de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose. A primeira referência de LTA no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “Antigüedad de la Syphilis en el Peru”, onde ele relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico (LAINSON, 1997; CAMARGO 2003; LAINSON, 1998; SANTOS, 1994; PARAGUASSU, 2001; citados por BASANO & CAMARGO, 2004).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ou do Novo Mundo tem como agentes etiológicos espécies do subgênero *Viannia* e *Leishmania* e está classificada em três formas clínicas básicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD).

A LCL tem como principal manifestação uma lesão ulcerada que se desenvolve no local da inoculação do parasito. O indivíduo desenvolve úlcera de bordos elevados, fundo plano, superfícies granulosas, geralmente autolimitada. Em algumas situações, a infecção pode se desenvolver de forma atípica, produzindo as formas disseminadas (LCDi) ou difusas (LCD). No primeiro caso

ocorre a presença de inúmeras lesões, geralmente pequenas e distribuídas por várias regiões do tegumento cutâneo, que respondem bem ao tratamento antimonial. No segundo, advém também a disseminação das lesões, mas nesse caso as lesões tendem à forma tuberosa, sem ulcerações, sendo por isso denominada difusa(LCD). Os parasitos são facilmente detectados e os pacientes de LCD respondem mal ao tratamento específico, levando à cronicidade da infecção e ao acometimento progressivo (AZEREDO–COUTINHO & MENDONÇA, 2014).

A LM é considerada uma forma secundária a uma infecção primária e a principal espécie associada é a *L. (V.) braziliensis*. Mais recentemente, a *L. (V.) guyanensis* vem sendo implicada como agente etiológico desta forma clínica na região amazônica (Guerra et al. 2011). A LM se apresenta com lesões ulceradas, eritematosas, podendo ser úlcero-vegetantes, acometendo principalmente a mucosa oronasofaríngeal, com comprometimento do septo cartilaginoso e demais áreas associadas (LIMA, 2017).

Neste estudo daremos ênfase à caracterização de espécies de *Leishmania* da forma LC circulantes em pacientes no estado de Roraima, visto que temos conhecimento prévio de estudos que identificam algumas espécies em pacientes do estado do Amazonas. Além disto, temos a possibilidade de introdução de espécies de *Leishmania* de países como Venezuela e Guiana.

2.2. Agentes etiológicos das leishmanioses

Diversas técnicas laboratoriais e de biologia molecular (eletroforese em gel, reação em cadeia de polimerase (PCR), Northern Blot, Southern Blot, Western Blot) têm sido empregadas no estudo dos parasitos causadores das leishmanioses com intuito de revelar a diversidade genética das espécies do gênero *Leishmania*. Um exemplo disto, é o da classificação das espécies de *Leishmania* em complexos nas décadas de 1970 a 1980 que tinha como base critérios extrínsecos, tais como comportamento do parasito em cultura e infecção experimental em hamster, que nos dias atuais, pôde ser validada por técnicas laboratoriais, consideradas o “método-ouro” atual para tipagem de *Leishmania*: o ensaio isoenzimático, ou eletroforese de isoenzima. A aplicação de taxonomia numérica a partir dos dados obtidos pela eletroforese de isoenzimas e análise

por marcadores moleculares, associados aos conceitos que foram utilizados para descrição de cada espécie, resulta no sistema de classificação das leishmanias atualmente (CUPOLILLO et al., 2014).

Nas Américas, são reconhecidas 12 espécies de *Leishmania* causadoras da LTA em humanos e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil, as três principais espécies causadora de LT são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni* (Silveira e cols., 1991), *L. (V.) naiffi* (Lainson & Shaw, 1988), *L. (V.) lindenbergi* (Silveira et al, 2002) e *L. (V.) shawi* (Lainson et al, 1988) foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017).

As espécies *L. (Vianna) guyanensis* (Floch, 1954), *Leishmania (Vianna) braziliensis* (Vianna, 1911) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Lainson e Shaw, 1972), são os principais agentes responsáveis pela maioria dos casos de LTA no Brasil.

Quadro 1: Principais espécies de *Leishmania* responsáveis pelas leishmanioses nas Américas, sua distribuição geográfica, vetores e formas clínicas.

| Espécie de <i>Leishmania</i> | Distribuição geográfica | Vetor | Forma Clínica |
|---|---|--|---------------|
| <i>Leishmania (Vianna) braziliensis</i> | Bacia da Amazônia Ocidental, América do Sul, Brasil, Bolívia, Peru Guatemala, Venezuela | <i>Lu. (N.) Anduzei</i> , <i>Lu. (Psy.) Ayrozai</i> , <i>Lu. (Ps.) Carrerai</i> *, <i>Lu. (V.) Columbiana</i> , <i>Lu. (Ps.) Complexa</i> *, <i>Lu. (Lu.) Cruciata</i> , <i>Lu. (Lu.) Edwardsi</i> , <i>Lu. (Pi.) Fischeri</i> *, <i>Lu. (Lu.) Gomezi</i> *, <i>Lu. (N.) Intermedia</i> , <i>Lu. (Lu.) Lichyi</i> , <i>Lu. (Ps.) Llanosmartinsi</i> *, <i>Lu. (Lu.) Longipalpis</i> , <i>Lu. (Lu.) Migonei</i> *, <i>Lu. (N.) Neivai</i> *, <i>Lu. (Lu.) Nuneztovari anglesi</i> *, <i>Lu. (V.) Ovallesi</i> *, <i>Lu. (Psy.) Panamensis</i> *, <i>Lu. (Psy.) Paraensis</i> , <i>Lu. (V.) Pescei</i> , <i>Lu. (Lu.) Pessoai</i> , <i>Lu. (V.) Pia</i> , <i>Lu. (X.) Shawi</i> *, <i>Lu. (V.) Spinicrassa</i> *, <i>Lu. (Psy.) Squamiventris</i> , <i>Lu. (Hel.) Tejadai</i> , <i>Lu. (Lu.) Citiesendi</i> , <i>Lu. (Lu.) Trinidadensis</i> , <i>Lu. (N.) Trapidoi</i> , <i>Lu. (N.) Umbralitis</i> , <i>Lu. (N.) Whitmani</i> *, <i>Lu. (Ps.) Wellcomei</i> *, <i>Lu. (N.) Ylephiletor</i> *, <i>Lu. (Lu.) Youngi</i> , <i>Lu. (Psy.) Yucumensis</i> * | LC, LMC |
| <i>Leishmania (Vianna) guyanensis</i> | Norte da América do Sul, Bolívia, Brasil, Francês Guiana, Suriname | <i>Lu. (N.) Anduzei</i> *, <i>Lu. (Hel.) Ayacuchensis</i> *, <i>Lu. (N.) Flaviscutellata</i> , <i>Lu. (V.) Longiflocosa</i> , <i>Lu. (Psy.) Llanosmartinsi</i> , <i>Lu. (Lu.) Migonei</i> , <i>Lu. (V.) Ovallesi</i> , <i>Lu. (N.) Shawi</i> *, <i>Lu. (N.) Umbratilis</i> *, <i>Lu. (N.) Whitmani</i> * | LC, LMC |

| | | | |
|--|---|---|--------------|
| <i>Leishmania (Viannia) panamensis</i> | América Central e do Sul, Brasil, Panamá, Venezuela, Colômbia | <i>Lu. (T.) Cruciata, Lu. (N.) Flaviscutellata, Lu. (Lu.) Gomezi *, Lu. (Hel.) Hartmanni *, Lu. (Mig.) Migonei, Lu. (V.) Ovallesi, Lu. (Psy.) Panamensis *, Lu. (Hel.) Sanguinaria, Lu. (V.) Spinicrassa, Lu. (N.) Trapidoi *, Lu. (N.) Umbratilis, Lu. (N.) Ylephiletor, Lu. (N.) Yuilli *</i> | LC, LMC |
| <i>Leishmania (Viannia) peruviana</i> | Peru, Bolívia | <i>Lu. (Hel.) Ayacuchensis *, Lu. (Hel.) Noguchii, Lu. (Hel.) Peruensis *, Lu. (Hel.) Tejadai, Lu. (V.) Verrucarum *</i> | LC, LMC |
| <i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i> | Brasil, Bolívia, Peru | <i>Lu. (V.) Nuneztovari Anglesi *, Lu. (N.) Olmeca Bicolor, Lu. (T.) Ubiquitalis *, Lu. (N.) Whitmani</i> | LC |
| <i>Leishmania (Viannia) naiff</i> | Brasil, Guiana Francesa | <i>Lu. (Psy.) Amazonensis, Lu. (Ps.) Ayrozai *, Lu. (Lu.) Gomezi, Lu. (Psy.) Paraensis, Lu. (Ps.) Squamiventris *, Lu. (N.) Trapidoi</i> | LC |
| <i>Leishmania (Viannia) shawi</i> | Brasil | <i>Lu. (N.) Whitmani *</i> | LC |
| <i>Leishmania (Viannia) colombiensis</i> | Colômbia | <i>Lu. (Lu.) gomezi, Lu. (Hel.) hartmanni*, Lu. (Psy.) Panamensis</i> | LC, LV |
| <i>Leishmania (Viannia) lindenbergi</i> | Brasil | <i>L. (Lu.) Antunesi</i> | LC |
| <i>L. utingensis</i> | Brasil | <i>Lu. (Vi.) Tuberculata</i> | LC |
| <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> | América do Sul (Bolívia, Brasil, Venezuela) | <i>Lu. (Lu.) Diabólica, Lu. (N.) Flaviscutellata *, Lu. (Lu.) Longipalpis *, Lu. (Lu.) Nuneztovari Anglesi *, Lu. (N.) Olmeca Novica *, Lu. (N.) Olmeca Reducta *, Lu. (V.) Townsendi, Lu. (N.) Ylephiletor, Lu. (V.) Youngi</i> | LC, LCD, LMC |
| <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> | Estados Unidos de América, Equador, Peru, Venezuela | <i>Lu. (D.) Anthophora, Lu. (Hel.) Ayacuchensis *, Lu. (C.) Christophei, Lu. (V.) Columbiana, Lu. (Lu.) Cruciata, Lu. (Lu.) Diabólica, Lu. (N.) Flaviscutellata, Lu. (Lu.) Gomezi, Lu. (Lu.) Longipalpis, Lu. (Lu.) Migonei, Lu. (N.) Olmeca Olmeca *, Lu. (V.) Ovallesi *, Lu. (Psy.) Panamensis, Lu. (Ps.) Shannoni, Lu. (N.) Ylephiletor</i> | LC, LCD |
| <i>Leishmania (Leishmania) venezuelensis</i> | Norte da América do Sul, Venezuela | <i>Lu. (Lu.) Lichyi, Lu. (N.) Olmeca Bicolor, Lu. (Ps.) Panamensis, Lu. (V.) Spinicrassa</i> | LC |

Fonte: Adaptado de AKHOUNDI *et al*, 2016.

Legenda: *: Vetor comprovado, Ad.: *Adlerius*, C.: *Coromyia*, LC: Leishmaniose cutânea, LMC: Leishmaniose mucocutânea, LCD: Leishmaniose cutânea difusa, Eu.: *Euphlebotomus*, Hel.: *Helcocyrtomyia*, L.: *Leishmania*, La.: *Larrousius*, Lu.:

Lutzomyia, Mig.: *Migonei*, N.: *Nyssomyia*, Ne.: *Neophlebotomus*, P.: *Phlebotomus*, Pa.: *Paraphlebotomus*, Pf.: *Pifanomyia*, Pi: *Pintomyia*, Ps.: *Psathyromyia*, Psy.: *Psychodopygus*, S.: *Sergentomyia*, Si.: *Sintonius*, Sy.: *Synphlebotomus*, T.: *Tricholateralis*, V.: *Verrucarum*, Vi.: *Viannamyia*, VL: Leishmaniose Visceral, XM: Mamífero (Marsupiais), XP: Mamífero (Porcos-espinhos), XR: Mamífero (Roedor), XS: Mamífero (preguiça).

2.3. Ciclo Biológico e agentes etiológicos da Leishmania

A leishmaniose é uma doença infecciosa transmitida por vetores, insetos denominados flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) e causada por diferentes espécies de protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania*. A infecção humana é causada por cerca de 21 das 30 espécies que infectam mamíferos.

O ciclo biológico das espécies *Leishmanias* é heteroxênico, alternando entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Durante a hematofagia, as formas promastigotas presentes no tubo digestório dos flebotomos fêmeas são inoculadas na junção derme-epiderme do hospedeiro vertebrado. Nesse local ocorre a fagocitose dos parasitos, que irão se transformar em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), entre elas o macrófago (Fig. 1). No interior dessas células os amastigotas multiplicam-se por divisão binária e são responsáveis pelas infecções, que podem persistir por todo o tempo de vida do hospedeiro, com risco provável de acarretar as lesões cutâneas e viscerais (CUPOLILLO *et al.*, 2014; CDC, 2018).

Recentemente, Serafim *et al* 2018 demonstraram que a ingestão de uma segunda refeição de sangue não infectada por flebotomíneos infectados com *Leishmania* desencadeia a diferenciação de promastigotas metacíclicos, considerada um estágio terminalmente diferenciado dentro do vetor (Bates, 2007), a um estágio semelhante ao leptomona, o promastigota retroleptomona. A metaciclogênese reversa ocorre após cada refeição de sangue subsequente, onde os promastigotas retroleptomona rapidamente se multiplicam e se diferenciam em promastigotas metacíclicos, aumentando a infecciosidade do mosquito flebotomíneo. É importante ressaltar que uma refeição de sangue

subsequente amplifica os poucos parasitas *Leishmania* adquiridos pela alimentação de hospedeiros infectados em 125 vezes e aumenta a frequência de lesões em quatro vezes, em flebotomíneos fêmeas alimentadas duas vezes, em comparação com flebotomíneos fêmeas alimentadas uma vez.

2.4. Vetores na transmissão da LTA

As leishmanioses seguem no escopo da saúde como doenças negligenciadas ao longo dos tempos em todo o mundo. Os vetores da LC são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros, dependendo da localização geográfica (Brasil, 2017). No mundo existe cerca de novecentas espécies de flebotomíneos descritas, dentre as quais mais de quatrocentas são encontrada nas Américas. Dentre estas, pouco mais de vinte espécies são consideradas vetores comprovados de leishmanioses no Novo Mundo (PIMENTA *et al.* 1992; BATES & ROGERS, 2004; BRAZIL & BRAZIL, 2014).

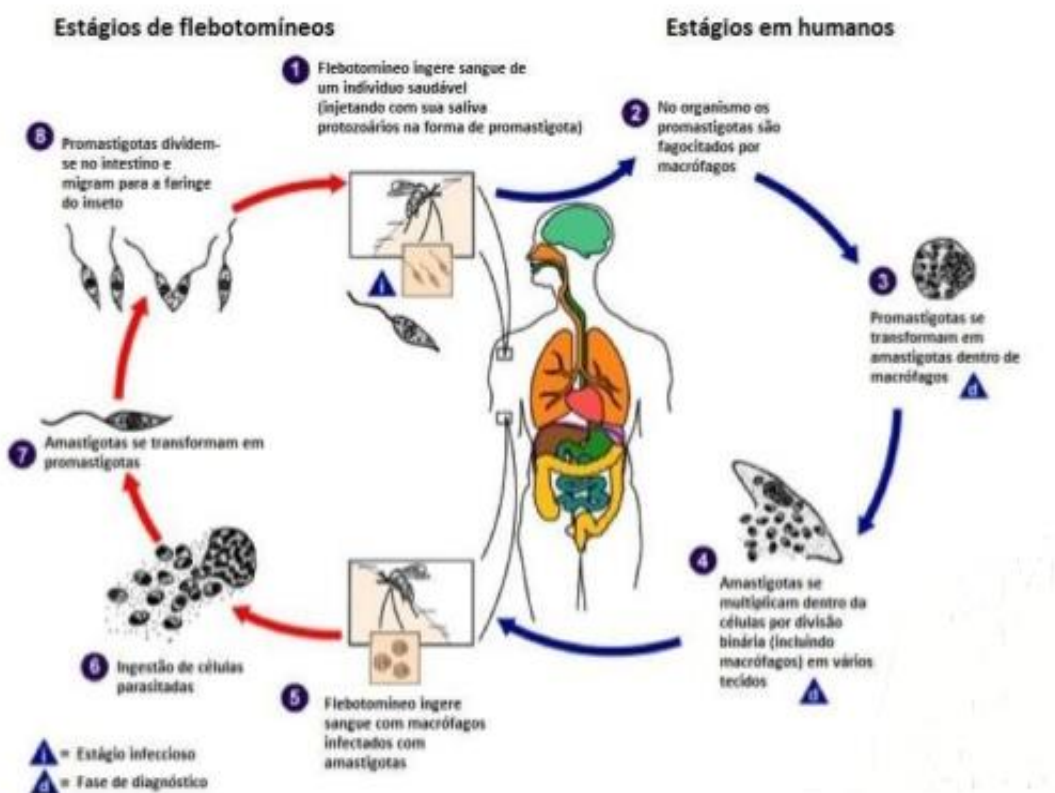
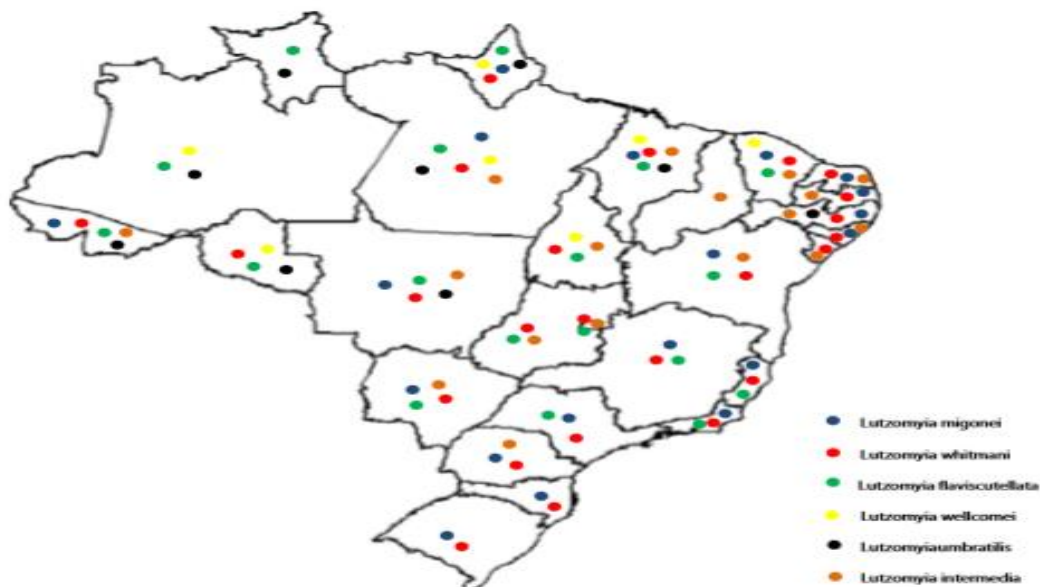


Figura 1: Ciclo biológico da *Leishmania* spp. - Fonte: adaptado de CDC (2018).

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei*. Essas espécies de flebotomíneos foram definidas como vetoras por atenderem aos critérios que atribuem a uma espécie a competência vetorial. Embora ainda não tenha sido comprovado o papel da *Lu. neivai* e *Lu. fischeri* como vetores da LC, estas espécies têm sido encontradas com frequência em ambientes domiciliares em áreas de transmissão da doença (BRASIL, 2017).

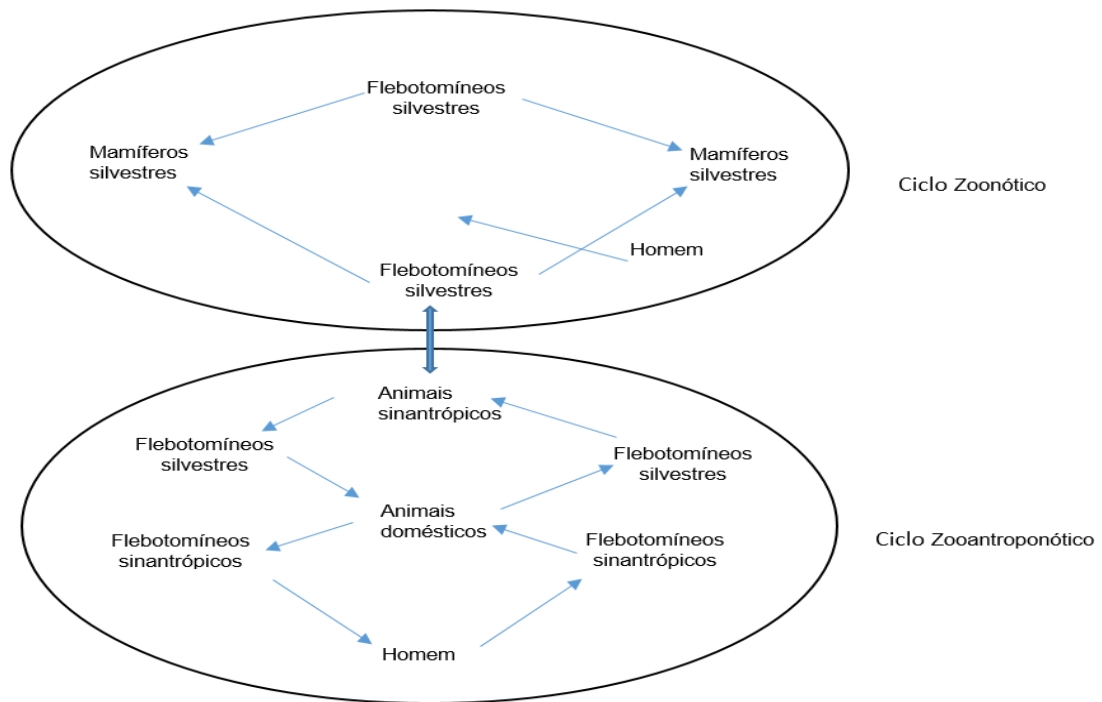
Relativamente ao ciclo de transmissão da LC (Fig. 3), sob o ponto de vista epidemiológico, trata-se de uma zoonose na qual animais silvestres e domésticos apresentam papéis fundamentais na manutenção do ciclo. Embora a transmissão clássica de todas as formas de LT se dê a partir da penetração do homem em área enzoótica, a variedade de espécies de *Leishmania* e flebotomíneos envolvidas determina algumas particularidades epidemiológicas, incluindo a adaptação para um aspecto mais periurbano na transmissão (BRAZIL & BRAZIL, 2014).

Figura 2 – Distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetoras da leishmaniose cutânea no Brasil, 2015.



Fonte: BRASIL, 2017.

Figura 3 - Ciclo de transmissão das leishmanioses no Brasil



Fonte: Adaptado de BRAZIL & BRAZIL 2014.

2.5. Reservatórios e hospedeiros na transmissão da *Leishmania* spp.

O conceito do que é um reservatório tem se modificado ao longo dos anos com os diversos métodos de estudo. No entanto, ainda hoje, o conceito do que é um reservatório é permeado por uma visão antropocêntrica, uma vez que reservatório é frequentemente referido como “a espécie animal que é fonte de infecção de um determinado parasito para o homem”. Na visão dos autores, além de antropocêntrico, esse conceito é fixista por não considerar o caráter dinâmico e, portanto, mutável das associações parasito-hospedeiro. Nesta perspectiva, considera-se reservatório, não apenas uma única espécie de mamífero infectado por uma espécie de parasito que potencialmente infecta o homem e animais domésticos em determinada localidade, mas como um sistema que pode incluir uma ou mais espécies de animais responsáveis pela manutenção de uma dada espécie de parasito na natureza (JANSEN & ROQUE, 2014).

Relativamente à definição de hospedeiro, Jansen & Roque 2014, destacam que um animal infectado é um hospedeiro do parasito, mas sua importância na manutenção do ciclo de transmissão numa dada área dependerá das particularidades da interação parasito-hospedeiro. Os autores classificam reservatório mantenedores aqueles mamíferos capazes de se infectar e manter infecções estáveis por uma determinada espécie de parasito e reservatórios amplificadores aqueles que, além de manter, apresentam um perfil de infecção que garante transmissibilidade desse parasito.

2.6. Epidemiologia das Leishmanioses

A LTA, como visto nos capítulos anteriores, é a forma mais comum de leishmaniose e causa lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes ao longo da vida e graves incapacidades. Cerca de 95% dos casos de LT ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Em 2015, mais de dois terços dos novos casos de LC ocorreram em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do Irã) e República Árabe da Síria. Estima-se que entre 600 mil e 1 milhão de novos casos ocorram em todo o mundo anualmente (WHO, 2018).

Nas Américas, um total de 940.396 casos novos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) foram reportados por 17 dos 18 países endêmicos no período de 2001-2017, com uma média anual de 55.317 casos. Em 2017, 49.959 casos foram reportados à Organização Pan-Americana da Saúde (SisLeish – OPAS/OMS) por 17 países endêmicos, visto que a Guiana Francesa segue reportando os dados diretamente à França. No geral, houve uma diminuição do número de casos em 9 países endêmicos, porém, o número total de casos da região manteve-se estável em relação a 2016, devido aos aumentos ocorridos no Brasil (38%), Costa Rica (94%), México (88%) e Equador (36%). Do total de casos de 2017, 72,6% foram reportados pelo Brasil (17.526), Colômbia (7.764), Peru (6.631) e Nicarágua (4.343). A taxa de incidência da Região foi de 22,51 casos por 100.000 habitantes, resultando em um aumento de 17,3% em relação

ao ano anterior (21,71 casos/100.000 hab.). As maiores taxas foram reportadas por Nicarágua (140/100.000 hab.), Suriname (121/100.000 hab.) e Costa Rica (51,7/100.000hab.). Cinco países apresentaram um aumento expressivo na taxa de incidência em comparação a 2016: El Salvador (9,36/100.000 hab.), Argentina (10,27/100.000 hab.), México (11,5/100.000 hab.), Equador (22,6/100.000 hab.) e Costa Rica (51,7/100.000 hab.) (OPAS, 2019).

A incidência da LTA no Brasil vem aumentando consideravelmente, apresentando em média 35.000 casos/ano e encontra-se distribuída desde o sul da Bacia Amazônica ao sul do país (Desjeux, 2004, FNS, 2002; Rebello et al, 2010). Uma das formas comuns da doença é a leishmaniose cutânea que ocorre em surtos ligados à derrubada das matas, à exploração desordenada da floresta e às atividades humanas ligadas à agricultura e ao lazer (COSTA, 2005).

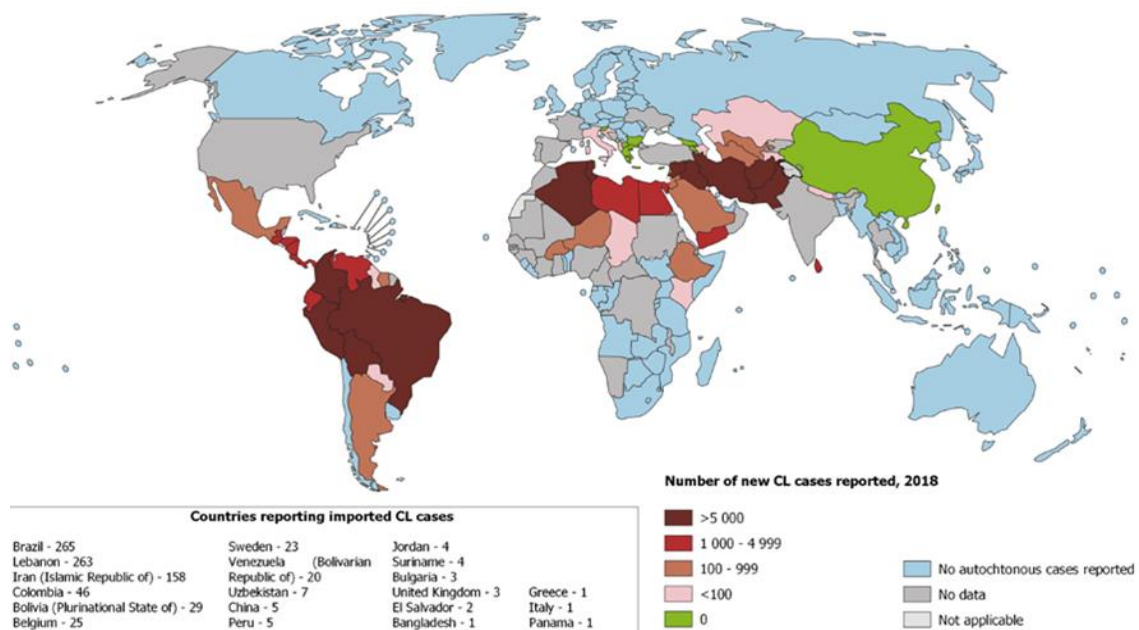


Figura 4 - Status de endemicidade de leishmaniose tegumentar no mundo, dados de 2018 - Fonte: adaptado de WHO (2020).

O Estado de Roraima, localizado no extremo norte do Brasil, inserido no contexto Amazônico, vem ganhando importância no cenário nacional devido ao constante número de casos notificados. Este fato é destacado Negrão e Ferreira

em 2014, aonde os autores revelam que no período estudado, o estado de Roraima apresentou 1.497 casos entre 1980 a 1990, entre 1991 a 2000 ocorreram 3.678 casos e de 2001 a 2010 3.940 casos, demonstrando assim um acréscimo no número de casos nas últimas três décadas. Em 2017, um estudo de Almeida e Brazil, detectou que, apenas em cinco anos (2011 a 2015), Roraima notificou 2238 casos de LC, confirmando o acréscimo da endemia no estado.

2.6. Diagnóstico e Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

2.6.1. Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar

A clínica e a magnitude da gravidade dos sinais e sintomas da LT é diversificada e está intimamente relacionada com a espécie de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro. O quadro clássico da LT são lesões ulceradas únicas ou múltiplas que se apresentam em qualquer região do corpo, como face, braços e pernas. Pode haver um grande número de lesões - às vezes até 200 - que podem causar sérias deficiências. Quando as úlceras cicatrizam, elas invariavelmente deixam cicatrizes permanentes, que muitas vezes são a causa de sérios preconceitos sociais (WHO, 2019).

No Brasil, temos referência da leishmaniose cutânea difusa, causada pela *L. (Leishmania) amazonensis*, que se caracteriza por lesões nodulares não-ulceradas, precedidas por úlcera única que evolui com disseminação linfática do parasito. Esta forma está associada a uma resposta imune celular deprimida que leva o paciente a um estado de anergia imunológica (NEVES *et al* 2005; GONTIJO & CARVALHO 2003; HANS-FILHO *et al* 2011).

A clínica da leishmaniose mucosa, se caracteriza por lesões em vias aéreas superiores, que podem levar à destruição parcial ou total das membranas das cavidades do nariz, boca e garganta e tecidos adjacentes. Esta forma incapacitante de leishmaniose pode levar a que o doente seja rejeitado pela comunidade (WHO, 2019).

2.6.2. Diagnóstico Laboratorial

O critério de diagnóstico de LT adotado pelo Ministério da Saúde (2017) é definido baseando-se em informações epidemiológicas, clínica e laboratorial. Entretanto, o MS alerta que o diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser complementado por pesquisa direta. Tendo em vista o número de doenças que faz diagnóstico diferencial com a LT, nos casos em que o diagnóstico não for conclusivo pelos métodos anteriores, o paciente deverá ser investigado por outros métodos de diagnósticos. O MS alerta ainda que a utilização de métodos de diagnóstico laboratorial visa não somente à confirmação dos achados clínicos, mas pode fornecer importantes informações epidemiológicas, como a identificação da espécie de *Leishmania* circulante, para orientar quanto às medidas a serem adotadas para o controle do agravo.

O diagnóstico de certeza, com encontro do parasito, pode ser possível através de pesquisa direta por aposição de tecido em lâmina, cultura em meio específico e inoculação em hamster, além de exame histopatológico e reação em cadeia de polimerase (PCR). Exames imunológicos e imunofluorescência indireta, são métodos indiretos que também auxiliam na definição diagnóstica (Brasil, 2017, Hans-Filho *et al* 2011). Neste trabalho, daremos foco na pesquisa direta do parasita em lâmina e a reação em cadeia de polimerase(PCR), visto serem as ferramentas diagnósticas que utilizamos para o desenvolvimento da pesquisa, seguida de sequenciamento.

Apesar da discordância de alguns autores, de que não existe um padrão ouro para o diagnóstico de LC, o MS da saúde recomenda a priori que as unidades de saúde do SUS tenham implantados em seus laboratórios de diagnóstico a pesquisa direta do parasita em raspados de lesão, fixados em lâminas e corados em Giemsa ou panótico para a visualização do parasita. Esta técnica está implantada em todos os laboratórios de saúde dos municípios de Roraima. Desta forma, o diagnóstico de LC em Roraima está condicionado a este método e eventualmente, nos casos mais complexos ou de leishmaniose mucosa-cutânea, faz-se biopsia ou aspirado para identificação do parasita. De fato, o exame parasitológico é o mais empregado principalmente em áreas endêmicas e particularmente na região Amazônica que apresenta positividade

elevada. Figueira e colaboradores (2014) observaram em 90 pacientes com LC, dentre estes 81 90%(n=81) tiveram exame direto positivo (LIMA, 2017).

2.6.3 Diagnóstico molecular

A biotecnologia a serviço do diagnóstico de diversas doenças tem avançado significativamente nas últimas décadas e a LT aparece como uma das doenças que tem sido avaliada por diversas técnicas moleculares. A Reação em cadeia de polimerase (PCR) aparece como principal técnica molecular utilizada, por apresentar vantagens como a rapidez, sensibilidade e elevada especificidade, quando comparada as técnicas convencionais baseada em pesquisa direta e cultura, além da identificação de espécies de *Leishmania*, e a utilização a partir de diferentes iniciadores (BERRAHAL *et al*, 1996; BELLI *et al*, 1998; FISA *et al* 2001; LACHAUD *et al* 2002; SINGH, 2006; REITHINGER e DUJARDIN, 2007; SATOW *et al* 2013; BONI, 2016).

2.7. Justificativa

Em Roraima, existem poucos estudos referentes à situação da LT em seu território, e estes, não discriminam a diversidade de espécies de *Leishmania* presentes no estado. Resumidamente, estes estudos, indicam um aumento do número de casos nos últimos anos, que poderia estar relacionado com a melhoria no sistema de notificação, movimentos migratórios de pessoas residentes no próprio estado, como também, de países fronteiriços como a Venezuela e Guiana suscetíveis para zonas de maior transmissão da doença ou por mudança do equilíbrio natural, em função da ocupação dos campos (lavrados) e matas com vistas à exploração agropecuária, garimpeira e madeireira. Dessa forma, em geral a LT ocorre em lugares de assentamentos populacionais recentes e relacionados a desmatamentos, em populações próximas a áreas de floresta primária, onde a *L. (V.) guyanensis* é a principal espécie envolvida, mas com o envolvimento de outras espécies do parasito.

Diante do exposto, há a necessidade de estudos prospectivos de campo, sobre Leishmaniose Tegumentar no estado de Roraima na predição de surtos e epidemias dessa endemia. A caracterização da ecoepidemiologia da LT, identificando a variedade de espécies de *Leishmania* que causam a doença e levam às suas diversas manifestações clínicas é preciso e neste sentido, este

trabalho, pode contribuir para o entendimento da doença no Estado permitindo a ampliação da complementação diagnóstica e tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar as espécies de *Leishmania* circulantes infectando humanos em amostras isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas do Estado de Roraima.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Identificar os casos suspeitos de LTA sob o ponto de vista clínico e exame parasitológico.
- ✓ Caracterizar as espécies de *Leishmania* em pacientes com diagnóstico parasitológico de LTA nos municípios de Caroebe, Rorainópolis, Pacaraima, Bonfim e Boa Vista no Estado de Roraima.
- ✓ Verificar a distribuição espacial das espécies de *Leishmania* identificadas de acordo com a procedência dos pacientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo experimental, descritivo, prospectivo realizado nos serviços de saúde que realizam diagnóstico de leishmaniose no estado de Roraima no período de 2016 a 2018. Foram incluídos no estudo os pacientes com hipótese diagnóstica de LC. atendidos no laboratório de referência do centro de saúde do Mecejana e na Casa de Saúde do Índio (CASAI) em Boa Vista e unidades de saúde dos municípios Mucajaí, Caroebe, ambos no Sul do estado e Pacaraima na fronteira com a Venezuela. Realizou-se nesses pacientes, coleta de amostras (escarificação de lesão), para realização de exame parasitológico e concomitantemente foram coletadas amostras de material do raspado em papel filtro para posterior caracterização das espécies de *Leishmania* por biologia molecular.

4.2. Caracterização da área de estudo

Roraima é um estado federado criado pelo Artigo 14 do Ato das Disposições Constitucionais Transitórias da Constituição Brasileira de 1988. Possui uma área de 225.116,1km, limitando-se ao norte com a República da Venezuela e Guiana; ao sul com os Estados do Amazonas e Pará; ao leste com a República Cooperativista da Guiana; ao oeste com o Estado do Amazonas e com a República da Venezuela. O total de fronteiras internacionais é de 1922 km (NASCIMENTO et al, 2003).

No senso de 2010, do Instituto Brasileira de Geografia e Estatística (I.B.G.E) a população do estado de Roraima era de 450.479 habitantes. Em 2017 a população estimada era de 522.636 habitantes, apontando um crescimento de 16% neste período (I.B.G.E, 2018). Conforme dados do Conselho Indígena de Roraima (CIR) de 2017, a população Indígena do estado era de 53.990 indígenas das etnias Ingarikó, Taurepang, Macuxí, Waimiri-Atroari, Wapixana, Wawai, Yanomami, Yekuana, Patamona, Saporá.

A capital do estado é Boa Vista, a única capital Brasileira localizada no hemisfério Norte. Roraima possui quinze municípios, a saber: Alto Alegre, Amajari, Boa Vista, Bomfim, Cantá, Caracaraí, Caroebe, Iracema, Mucajaí, Normandia, Pacaraima, Rorainópolis, São João da Baliza, São Luiz e Uiramutã.

A fig. 7 demonstra o mapa do Brasil e o estado de Roraima com os 15 municípios, e suas regiões de fronteiras internacionais com a Venezuela, Guiana e em território Brasileiro com os estados do Amazonas e Pará.

A agricultura, a pecuária e as atividades ligadas ao extrativismo mineral e vegetal, aliadas ao grande e maior empregador, o Estado, constituem a base da economia do estado de Roraima, (FREITAS, 2012).



Fonte: mapsofword 2019.

Figura 7 – Mapa do Brasil e do estado de Roraima com os 15 municípios e suas áreas de fronteiras em território Brasileiro e Internacional.

Relativamente aos biomas brasileiros, Roraima está localizado no bioma da Amazônia. A figura 8 demonstra a área de estudo inserido neste bioma, bem como o estado e os municípios que foram selecionados para os postos de coletas de amostras para esta pesquisa.

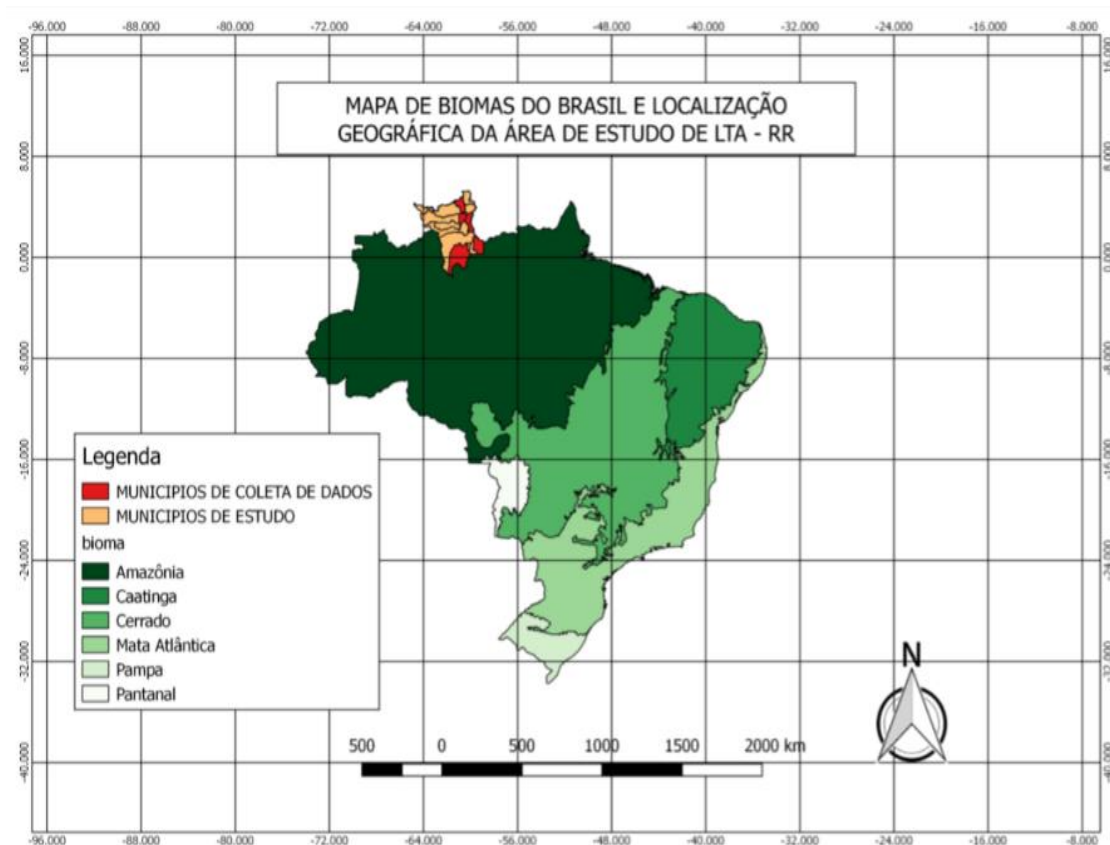


Figura 8 – Mapa de Biomas do Brasil e localização geográfica do estado de Roraima e os municípios de coleta de material para este estudo de Leishmaniose Tegumentar Americana.

4.3. Coleta de material biológico de indivíduos com suspeita clínica de LT

As amostras foram coletadas de todos os pacientes que possuíssem hipótese diagnóstica de LC que procuraram as unidades de saúde selecionadas para coleta na demanda espontânea. Foram utilizados como critério de inclusão os pacientes com hipótese diagnóstica de LC e que concordaram participar da pesquisa assinando seu consentimento logo no momento da coleta do material.

Os riscos foram mínimos como leve desconforto pela punção e/ou escarificação que cessavam logo após o procedimento não havendo necessidade de intervenção médica. Foi solicitado autorização para realização de fotos das lesões e todos tiveram o direito garantido de serem excluídos da pesquisa caso manifestasse interesse. O estudo foi aprovado pelo comitê de

ética da Universidade Federal de Roraima sob o nº CAAE 57445116.3.0000.5302.

Com a colaboração estabelecida com os serviços de saúde dos municípios, foram coletadas amostras através de escarificação de borda da lesão de cada paciente com lesão suspeita de LC nas unidades de saúde selecionadas para realização do exame direto de sangue e tecidos cutâneos da lesão. Concomitantemente, foi coletado amostras em papel filtro para se proceder a caracterização biomolecular(Fig. 9). As amostras coletadas foram estocadas em geladeira nas unidades de saúde e mensalmente eram recolhidas e novamente estocadas em geladeira para posterior envio ao laboratório de biologia molecular no Rio de Janeiro. As amostras devidamente identificadas, foram enviadas pelo sistema SEDEX do correio brasileiro ou oportunamente por algum pesquisador, professores ou alunos que fosse ao Rio de Janeiro.



Figura 9 – Coleta de amostras de paciente. Imagem A= Foto de lesão característica de LT em região da face externa do tornozelo esquerdo de um paciente e imagem B, inprint em papel filtro da lesão.

4.4. Diagnóstico clínico, parasitológico e molecular

4.4.1. Exame Clínico

O exame clínico foi realizado em todos os pacientes com aplicação de um roteiro de entrevista contendo dados socioeconômicos e de identificação dos pacientes, presença de lesões (quantidade), antecedente de leishmaniose com tratamento ou não.

4.4.2. Diagnóstico Parasitológico direto

O exame direto foi realizado por coleta de material biológico da borda da lesão ulcerada (escarificação) empregando-se de técnica asséptica com lanceta e/ou bisturi estéril. Com o material coletado foram feitos os esfregaços em lâminas, fixados com metanol e corados pelo Giemsa e/ou Panótico. A leitura das lâminas foi feita através de microscopia óptica em aumento de 100X (BRASIL, 2017).

4.4.3. Diagnóstico molecular

4.4.3.1. Obtenção de extrato total do papel de filtro

Cada disco referente ao exsudado de uma lesão de LC foram analisados individualmente em 100 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 9,2 contendo 10 mM de EDTA e 100 µg/mL de proteinase K). As preparações serão incubadas (2 a 3 hs, 56° C) com agitações periódicas e centrifugadas (9.800g, 15 min, 4° C). Os sobrenadantes foram coletados e aquecidos (15 min, 95° C). Posteriormente, as amostras foram mais uma vez centrifugadas (9.800g, 40 seg, 4° C). Os volumes das preparações serão ajustados para 200 µL com TE 0,1X e estocadas (-20° C) até o momento da extração do DNA total.

4.4.3.2. Extração de DNA

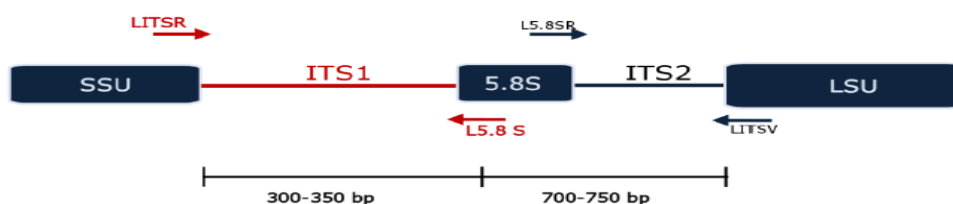
A extração de DNA a partir dos lisados do papel de filtro foi realizada utilizando o kit comercial de extração Genra Puregene® Cell and Tissue (QIAGEN), as concentrações dos reagentes não foram especificadas pelo fabricante. A extração das amostras seguiu utilizando a mesma sequência da metodologia para todas amostras. Os microtubos de polipropileno contendo as

amostras foram retiradas do freezer -20°C e, após o descongelamento, as amostras foram macerados, com ajuda de um pistilo estéril e descartável, foi adicionado em 100µL de solução de lise celular, contendo 1µl de proteinase K nos microtubos. Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria a 55°C *overnight*. Após esse período, foi adicionado 1µl de RNase, os microtubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora, incubado por 1 min no gelo e foi adicionado 100µl de solução de precipitação de proteína. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a 14.000rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril e identificado, contendo 300µL de isopropanol (100%). Os microtubos foram homogeneizados e, novamente, centrifugados por 5 minutos a 14.000rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300µl de etanol (70%) e 30µl de acetado de sódio (10%) em cada amostra. Os tubos foram incubados em freezer - 80°C por 1 hora e, posteriormente foram centrifugados por 5 minutos a 14.000rpm. Ao término da centrifugação, descartou-se novamente o sobrenadante e os microtubos foram invertidos em papel absorvente para a evaporação do etanol. O DNA extraído foi ressuspensão em 20µl de solução de reidratação e os microtubos foram incubados a 65°C por 1 hora para a reidratação do DNA. Em seguida, o DNA foi incubado em temperatura ambiente *overnight*, e posteriormente, foram estocados em freezer -20°C até a utilização. As amostras de DNA total extraído das amostras em papel filtro chegaram a uma concentração final média de 100 ng/µL.

4.4.3.3. PCR para detectar DNA de *Leishmania* spp. nas amostras coletadas.

A PCR ITS1 foi realizada a partir do DNA extraído do papel de filtro e submetido para amplificação de uma região alvo do DNA de *Leishmania* spp. para essas análises utilizamos dois indicadores: o ITS1 (internal transcribed spacer 1) (LITSR 5'CTGGATCATTTTCCGATG3' e L5.8S 5'TGATACCACTTATCGCACTT3' amplificam um fragmento de aproximadamente 350pb) (Schonian et al., 2003), que é uma região intergênica

entre os genes SSU e 5.8S (Figura 10), podendo distinguir as seguintes espécies de *Leishmania*: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania trópica*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamanensis* (CUPOLILLO ET AL., 2009).



Fonte: SOUZA, 2015.

Figura 10 - Região intergênica do ITS1.

Na PCR ITS 1 foi realizada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 350pb por meio da seguinte reação: solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de mistura de dNTPs, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen) e 5 µl de DNA molde, em um volume final de 25µL. A amplificação foi realizada alternando-se 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 30seg, anelamento a 53°C por 1min e extensão a 72°C por 1min em equipamento termociclador automático de DNA (MaxyGene Gradient - AXYGENE®). Os perfis banda amplificada foram analisados em gel de agarose 2% corado com GelRed™, concentração utilizada: GelRed 10.000X em 500µl de água livre de contaminações (1:500), foi aplicado 1µl de GelRed™ diluído, 01µl de tampão de carregamento e 5µl de produto amplificado na PCR, e comparados com produto de PCR de cepas referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

Na PCR kDNA, a presença de DNA de *Leishmania* foi detectada usando primers específicos para subgênero que têm como alvo o DNA de minicírculo-cinetoplasto (kDNA) do subgênero *Leishmania* ou *Viannia* (Tabela 1).

As amostras positivas para o subgênero *Leishmania* foram avaliadas posteriormente por PCR específico, utilizando primers derivados do kDNA do maxicículo, capazes de detectar *L. amazonensis* (primer: Lam_kDNA_F, sequência 5' AATAATTAATAAACCTCACATAAT 3' e primer L_kDNA_R1 com sequência 5' TGCTTGTTAACCTGCTCGAACCTT 3', com Amplicon size de 294 bp respectivamente) e *L. infantum* (primer : Linf_kDNA_F2, com sequência 5' ATTCTACATAATTAATAAACCTCAA 3', e primer L_kDNA_R2, com sequência 5' CTTTGTAAAGGAGAGTAGGACTTGCCC 3' com Amplicon size de 183 bp respectivamente), (CARDOSO *et al.*, 2019).

A especificidade de cada par de iniciadores foi verificada usando 1 ng de DNAs dos seguintes parasitas: *L. amazonensis* (IFLA / BR / 1967 / PH8), *L. braziliensis* (MHOM / BR / 75 / M2904), *L. infantum* (MHOM / BR / 1974 / PP75), nas condições de reação descritas abaixo. A sensibilidade da PCR também foi realizada para cada par de iniciadores a partir de diluições em série de 10 ng a 1 fg dos seguintes DNAs: *L. amazonensis* e *L. infantum* para os primers kDNA.Leish_F / kDNA.Leish_R (Cardoso *et al.*, 2019); *L. braziliensis* para MP1L / MP3H (Lopez, *et al.*, 1993); *L. amazonensis* para Lam_kDNA_F / L_kDNA_R e *L. infantum* para Linf_kDNA_F2 / L_kDNA_R2 (Cardoso *et al.*, 2019).

Tabela 1. Iniciadores utilizados nas reações de PCR com suas respectivas sequências e tamanhos de produtos amplificados.

| ALVO | PRIMER | SEQUÊNCIA | AMPLIFICAÇÃO |
|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|--------------|
| Subgênero Leishmania | kDNA.Leish.F | 5'CGTGGGGGAGGGGCGTTCT 3' | 135 bp |
| | kDNA.Leish.R | 5'CCGAAGCAGCCGCCCTATT 3' | |
| Subgênero Viannia | MP1L (Lopez, <i>et al.</i> , 1993) | 5' TACTCCCCGACATGCCTCTG 3' | 70 bp |
| | MP3H (Lopez, <i>et al.</i> , 1993) | 5' GAACGGGGTTTCTGTATGC 3' | |

Fonte: Adaptado de Cardoso *et al.* 2019.

As PCRs foram realizadas em reações de 20 µL, contendo 1X de tampão verde GoTaq (Promega), dNTPs 0,2 mM, 0,5 µM de cada iniciador, 1 U de polimerase Taq de DNA (Phoneutria) e 1 ou 5 µL de DNA. As PCRs das amostras

em papel filtro foram realizadas em duas etapas. Inicialmente, as amostras foram analisadas em poças de 5 pacientes para triagem inicial com os primers específicos dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Nesse caso, foram utilizados 5 µL de cada pool por PCR. Posteriormente, amostras individuais de DNA dos pacientes de cada pool positivo foram submetidas à PCR usando o subgênero *Leishmania* e *Viannia*. As condições do ciclo térmico consistiram em uma desnaturação inicial a 94 ° C por 5 min; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 30 s, recozimento a 56°C para o subgênero *Leishmania*, 60°C para o subgênero *Viannia* por 30 s, e extensão a 72°C por 30 s; e um passo final de extensão a 72 ° C por 7 min. O tamanho esperado das bandas para cada reação é indicado na Tabela 1. Os produtos amplificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 2,0% em 1x tampão TAE contendo 0,5 µg / mL de brometo de etídio e visualizados à luz UV, usando o ImageQuant LAS 4000 (GE Ciências da Vida em Saúde).

4.4.3.4. Sequenciamento

Após a coleta das amostras em papel filtro, foi realizada a extração do DNA com o kit Gentra Puregene Tissue (QIAGEN®), seguindo o protocolo do fabricante. A PCR do espaçador transcrito interno 1 foi realizada usando os iniciadores LITSR (5'CTGGATCATTTTCCGATG3') e L5.8S (5'TGATACCACTTATCGCACTT3 ') como previamente descrito (SCHONIAN, 2003).

As respostas positivas na PCR foram estabelecidas para MacroGen® (Seul, Coréia) para sequenciamento SANGER bidirecional usando um sequenciador automático (Applied Biosystems 3730XL). As sequências foram alinhadas e analisadas usando o programa Sequencher®4.1.4 e subsequentemente comparadas por BLAST e depositadas no GenBank (ID da amostra: MT606220 - MT606276), (GenBank, 2020).

4.4.3.5. Análise discriminante de componentes principais e análise filogenética

A fim de fornecer confirmação adicional para as espécies detectadas pelo Blast, as sequências de fasta resultantes foram usadas para análise discriminante dos componentes principais. Resumidamente, as sequências de *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi* foram limpos antes da análise genética para garantir que apenas dados de alta qualidade permaneçam. O parâmetro usou posições excluídas com mais de 30% de chamadas perdidas. Sequências de referência das cepas de *L. panamensis* PSC1, *L. braziliensis* LH2215, *L. amazonensis* M2269 e *L. mexicana* LEM2284 foram incluídas e os dados foram analisados no pacote R adegenet (SIEVERS, *et al*, 2011)).

O diagnóstico molecular foi realizado em colaboração com os seguintes laboratórios: Laboratório de Doenças Parasitárias-IOC, Rio de Janeiro, Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas-IOC, Rio de Janeiro, com a ajuda técnica do Dr. Cristian Ferreira de Souza e do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, com ajuda técnica da Dr^a. Daniella Castanheira Bartholomeu e seu grupo de pesquisa.

5. Análise Estatística

Os dados obtidos no estudo foram organizados em uma planilha do Microsoft Excell 2013® e utilizados para análise dos dados no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Devido à natureza categórica das amostras, os dados foram analisados pelo teste ChiSquare (x2) no BioEstat 5.0 , com nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$).

6. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão apresentados em formato de artigos:

Artigo 1.

Almeida JV, Brazil RP (2017) Retrospective Study of Cutaneous Leishmaniasis in The State of Roraima, North of Brazil. J Dermatolog Clin Res 5(4): 1108.

Artigo 2.

ALMEIDA, Joseneide Viana de *et al* . Parasitological and molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis among indigenous peoples in the state of Roraima, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 53, e20200006, 2020 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822020000100358&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 09 nov. 2020. Epub 21-Out-2020. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0006-2020>.

Artigo 3.

Joseneide Viana de Almeida; Cristian Ferreira de Souza; Andressa Alencastre Fuzari; Christie A. Joya; Hugo Oswaldo Valdivia; Daniella Castanheira Bartholomeu e Reginaldo Peçanha Brazil. Diagnosis and characterization of *Leishmania* species in patients with cutaneous leishmaniasis in the state of Roraima, Brazil's Amazon Region. Artigo submetido ao periódico Parasites & Vectors, aguardando o aceite para publicação.

Artigo 1. Retrospective Study of Cutaneous Leishmaniasis in The State of Roraima, North of Brazil. J Dermatolog Clin Res 5(4): 1108. 2017.

Joseneide Viana de Almeida, Reginaldo Peçanha Brazil

Publicado no Journal of Dermatology and Clinical Research 5(4): 1108. 2017.

ISSN: 2373-9371

Durante a construção do projeto de pesquisa do doutorado percebemos que havia poucos estudos sobre a epidemiologia da LT no Estado de Roraima. Desta forma, para entendermos o comportamento da doença, procedeu-se uma revisão bibliográfica acerca da epidemiologia da Leishmaniose Cutânea no estado de Roraima, através de um estudo retrospectivo no período de 2011 a 2015 dos casos notificados com diagnósticos confirmado para LC constante no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde do Brasil. O estudo mostra a predominância da forma cutânea da leishmaniose em Roraima e sugere a atividade de lazer, garimpo, agricultura e o ambiente do domicílio como fatores preditivos importantes para a infecção. Para além disto, revela-se ainda a importância de termos estudos publicados sobre a LC no estado, para que fomente a pesquisa e também sirva de fonte para trabalhos acadêmicos, órgão públicos, privados e demais pessoas interessadas em estudos sobre esta patologia.

Case Report

Retrospective Study of Cutaneous Leishmaniasis in The State of Roraima, North of Brazil

Joseneide Viana de Almeida^{1*} and Reginaldo Peçanha Brazil²

Laboratory of Parasitic Diseases, Roraima State University, Brazil

*Corresponding author

Joseneide Viana de Almeida, Reginaldo P Brazil, Email: jvaenf@yahoo.com.br, brazil.reginaldo@gmail.com

Submitted: 09 June 2017

Accepted: 20 July 2017

Published: 22 July 2017

Copyright

© 2017 de Almeida et al.

OPEN ACCESS

Keywords

- Cutaneous leishmaniasis
- Sinan
- Roraima
- Amazonian region
- Brazil

Abstract

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is among the neglected and reemerging diseases with outbreaks around the world. In Brazil, the northern region presents the highest incidence, presenting cases in all states of the Amazon region, and specifically the State of Roraima center of attention of our study. This communication brings a bibliographic review about the epidemiological behavior of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the State of Roraima, through a retrospective study in the period 2011 to 2015 of the cases reported with diagnoses confirmed for ACL observed in the Notification Disease Information System of the Ministry of Health of Brazil. We found 2,238 reports of confirmed cases and explored according to the variables: number of cases reported, sex, age, race, clinical form and case evolution. The majority of the patients were male (80.83%), cutaneous form of the disease (97.32%) was predominant among the reported cases. The main age group in the number of cases was people aged 20-39 years. Regarding race, we highlight an increasing number of cases (287) of ACL among Amerindians, and we still emphasize a high number (86) of abandonment of treatment. This study shows the predominance of cutaneous form of ACL in Roraima and suggests the activity of forest exploitation, leisure, mining, agriculture and residential environment as important predictive factors for infection. However, there is a lack of publications on the identification of the species of *Leishmania* responsible for ACL, their vectors and distribution in the state.

INTRODUCTION

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is conceptually defined as an infectious, non-contagious disease caused by different protozoan species of the genus *Leishmania*, which affects the skin and mucous membranes of mammals. Primarily, it is a zoonotic infection, affecting animals other than humans, which can be involved secondarily [1].

In the Brazilian Unified Health System (SUS), leishmaniasis is considered a major public health problem and represents a complex of diseases with clinical aspects and epidemiological diversity that need to be better studied. The World Health Organization (WHO) estimates that more than 350 million people in 88 countries around the world are in risk areas and cutaneous leishmaniasis is the most common form of the disease with approximately 12 million people infected worldwide and two million new cases annually [2].

In 2014, a total of 16 endemic countries reported 51,098 cases of cutaneous / mucosal leishmaniasis with an incidence rate of 19.76 cases per 100,000 inhabitants (data from Suriname and French Guiana were not included in the system). A total of 75% of the cases detected were reported by Brazil (20,418), Colombia (11,586) and Peru (6,231). However, the highest incidences were recorded in Nicaragua (62.97 / 100,000 inhabitants) and

Costa Rica (52, 55 / 100,000 inhabitants), countries of Central Americas region [3].

The incidence of ACL in Brazil has increased considerably, with an average of 35,000 cases / year and is distributed from the southern Amazon Basin to the south of the country [4-6]. The frequent forms of the disease is the cutaneous form that occurs in epidemic outbreaks related to forest clearing, disordered forest exploitation, and human activities linked to agriculture and recreation [7].

In the Amazon Region, seven species of *Leishmania* are responsible for the cases of ACL, and the species *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the one with the greatest pathogenic potential in humans and is related not only to cutaneous infection, but also to the severe clinical form of long-term, with destructive mucosal lesions [8-10].

Due to the complex interaction between the *Leishmania* species that act as etiological agents in the Amazon region, the diversity of vectors and the different clinical manifestations of the disease in the host make the understanding of the pathogenesis of ACL in this region a challenge.

The importance for a better epidemiological understanding of ACL consists not only in the information that it has a wide geographic distribution in the country, but also because of the

Cite this article: de Almeida JV, Brazil RP (2017) Retrospective Study of Cutaneous Leishmaniasis in The State of Roraima, North of Brazil. J Dermatol Clin Res 5(4): 1108.

fact that clinical forms that can lead to permanent lesions is likely to cause serious psycho-social impairments in the affected individual. Understanding it globally is fundamental to adopt measures that can minimize its incidence and, consequently, the suffering of those who live with this anthroponosis [11].

The State of Roraima, located in the extreme north of Brazil, has been gaining importance in the national context due to the constant number of reported cases, highlighted in the study published in 2014 "considerations on American Cutaneous Leishmaniasis and its expansion in the Brazilian territory" [12], where the authors show that in the period studied, the state of Roraima presented 1,497 cases between 1980 and 1990, between 1991 and 2000 there were 3,678 cases and from 2001 to 2010 3,940 cases, thus demonstrating an increase in the number of cases in the last three decades.

In the last two years we had been observing an increasing number of people, from several areas in Roraima, with suspicion of cutaneous leishmaniasis so we decide to do a retrospective report of the real situation for a preliminary epidemiological study of ACL in the State.

MATERIAL AND METHODS

The State of Roraima, located in north of Brazil, bordering Venezuela in the west and north of the state, Guiana at east and the states of Amazon and Pará in the south. In the year 2010, the IBGE census shows a population of 450,479 inhabitants with a projection for 2015 of 505,665 inhabitants and a growth of 12.5% per year. Currently the population of the State is estimated at 523,274 inhabitants (IBGE,2017).

An epidemiological survey of American Cutaneous Leishmaniasis in the state of Roraima, Brazil was carried out through a retrospective study in the period from 2011 to 2015 of the cases reported by Notification Disease Information System (SINAN) [13]. The following information were collected: number of reported cases, sex, age, race and clinical form.

RESULTS AND DISCUSSION

During the study period, 2,238 confirmed cases of ACL were observed in the State of Roraima. The year of 2013 presented the highest number of cases, and 2011, the lowest (Table 1). We also can observe that (Figure 1) the distribution of ACL seems to be concentrate in the South region of the state. This area is immerse in the amazon region with terra firme and semideciduous forest and an area of savanna type of vegetation going from central to north of the state.

In Brazil, the incidence of leishmaniasis is high and ACL is the one that appears most frequently in epidemic outbreaks related to the disorderly deforestation of primary forest areas, agriculture activities, mining and also leisure activities [3]. The number of reported cases in the North of the country reveals that the ACL is endemic in the state of Roraima, which has been on the ascension for the last two decades, highlighting that there is a migratory movement of people to the state in search of new job opportunities [2,14]. It is also observed that the northern region of Brazil represents the major problem of the disease in the present decade, starting in 2010, since it currently contributes

Table 1: Distribution of ACL cases in the State of Roraima, Brazil, from 2011 to 2015.

| Year | Number of cases |
|-------|-----------------|
| 2011 | 231 |
| 2012 | 466 |
| 2013 | 546 |
| 2014 | 489 |
| 2015 | 506 |
| Total | 2238 |

with the largest number of cases detected with 98,406 cases (39.54% of the total cases registered in the period). It is also noted that the risk of the population of the North region suffering from ACL was 68.01 / 100,000 inhabitants, five times higher than the national average (13.63 / 100,000 inhabitants) [14].

Regarding the gender of patients with ACL, 80.83% were male and 19.17% were female (Table 2). These results are in line with the latest figures presented in reports on the distribution of ACL in the Americas in 2016 [5]. The high incidence of ACL related to males has been attributed due to the fact that they are in greater contact with forest regions on occasion travel and / or work and / or leisure and the low incidence in the female gender may be related to the lower aspects of domiciliary or peridomiciliary transmission in this region.

According to Table 3, the clinical form was predominantly cutaneous (97.32%) and few cases in the mucosal form (2.68%). The data in this study are similar to that reported in the PAHO report (2016) [4], where the total number of cases of ACL in the Americas indicates that 95.84% (47,046) of the clinical forms correspond to the cutaneous form and 4.16 % (1,953)

Table 2: Cases of ACL, according to the year of notification and the gender of the patients, in the State of Roraima, Brazil, from 2011 to 2015.

| Year | Male N % | Female N % |
|-------|------------|------------|
| 2011 | 181 78,35 | 50 21,65 |
| 2012 | 388 83,26 | 78 16,74 |
| 2013 | 443 81,13 | 103 18,87 |
| 2014 | 401 82,00 | 88 18,00 |
| 2015 | 396 78,26 | 110 21,74 |
| Total | 1809 80,83 | 429 19,17 |

Table 3: Cases of LTA, according to the clinical form, in the State of Roraima, Brazil, from 2011 to 2015.

| Year | Cutaneous N % | Mucocutaneous N % |
|-------|---------------|-------------------|
| 2011 | 223 96,54 | 8 3,46 |
| 2012 | 451 96,78 | 15 3,22 |
| 2013 | 527 96,52 | 19 3,48 |
| 2014 | 478 97,75 | 11 2,25 |
| 2015 | 499 98,62 | 7 1,38 |
| TOTAL | 2178 97,32 | 60 2,68 |

Table 4: Cases of ACL, according to the year of occurrence and the patient's age range, in the State of Roraima, Brazil, from 2011 to 2015.

| Age (year) | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 |
|------------|------|------|------|------|------|
| < 1 | 2 | 6 | 9 | 3 | 3 |
| 1 – 4 | 1 | 6 | 10 | 13 | 16 |
| 5 – 9 | 4 | 10 | 31 | 11 | 14 |
| 10 – 14 | 19 | 30 | 32 | 30 | 41 |
| 15 – 19 | 26 | 67 | 84 | 86 | 82 |
| 20 – 39 | 108 | 237 | 241 | 227 | 229 |
| 40 – 59 | 56 | 88 | 119 | 98 | 95 |
| 60 – 64 | 6 | 15 | 10 | 6 | 14 |
| 65 – 69 | 3 | 3 | 3 | 7 | 5 |
| 70 – 79 | 4 | 4 | 6 | 8 | 4 |
| 80 e + | 2 | - | 1 | - | 3 |
| TOTAL | 231 | 466 | 546 | 489 | 506 |

Table 5: Cases of ACL, according to race, in the State of Roraima, Brazil, from 2011 to 2015.

| Year | Ignored | White | Negro | Asian | Brown | Amerindian |
|-------|---------|-------|-------|-------|-------|------------|
| 2011 | 8 | 20 | 18 | 3 | 155 | 27 |
| 2012 | 14 | 75 | 16 | 2 | 311 | 48 |
| 2013 | 12 | 50 | 32 | 13 | 380 | 59 |
| 2014 | 47 | 33 | 26 | 15 | 309 | 59 |
| 2015 | 22 | 68 | 38 | 11 | 273 | 94 |
| TOTAL | 103 | 246 | 130 | 44 | 1428 | 287 |

the mucosal / mucocutaneous form, which is considered severe because it produces incapacity and mutilations, if not treated in an early and adequate way.

In the evaluation by age group and year (Table 4), the highest percentage of cases occurred in patients aged 20-39 years. An age group that concentrates the largest proportion of the active work force in the field, therefore, these people are exposed to sand fly vector. It is also worth noting the constant presence of cases in all years in the age group between 1 and 9 years, which can lead us to believe that in some areas intra and peridomiciliary transmission may be occurring, since in this age group, the majority of people do not leave the domiciled or in peridomiciliary area frequently.

Similar data were found in a study in Sarandi in the southern Brazilian state of Paraná [15] and in the municipality of Juína, in the state of Mato Grosso in the Brazilian Amazon [16] demonstrating that the ACL has its endemic distribution in the country with similar epidemiological aspect in both regions.

In the evaluation by race over the years (Table 5), it can be seen that the highest incidence occurred in mixed race people and that the occurrence of ACL in the Amerindian population persists and increased significantly in the year 2015.

The data of this report are consistent with a study on the epidemiological characteristics of ACL in Assis Brasil on the Amazon frontier of the State of Acre [17] similar to the state of Roraima in its general forest, economic, and border constitution. In the evaluation by clinical evolution (Table 6), we noticed that most patients were discharged by cure (1,875). It is also noted

that the number of ignored or blank cases (134) in the system is significant and that 86 of the patients abandoned treatment over the years. It is noteworthy that 34 patients reported in the period did not have their clinical evolution defined in the system. The data of this survey are similar to a historical series of 21 years [18] study on cutaneous leishmaniasis in the municipality of Jussara, state of Paraná, South Brazil.

CONCLUSIONS

Analysis of this survey concluded that in Roraima State ACL, during in the period of 2011 to 2015, occurred in 2,238 people punctually notified by SINAN, with the largest number of cases belonging to the male gender, in the age group between 20 and 39 years, most declared as mixed race with a real increase in number among Amerindian population.

ACL can be considered endemic in the population of the State of Roraima with several factors that contribute to transmission. System needs an improvement in order to better define the clinical form that the patient was discharged. Although, the majority of ACL cases were discharged as cured by the system, we observed that there is a high index of patients who were considered ignored. There is also a large number of treatment abandonment, which may contribute to the permanence of the transmission cycle between humans and vectors in the state. It's also observed that several patients did not have their clinical situation defined, demonstrating that the.

Notification measures have been taken in the state, and that disease control measures, such as diagnosis increment,

Table 6: Cases of ACL, according to clinical evolution, in the State of Roraima, Brazil, from 2011 to 2015

| Year | Ignored | Cured | desertion | Death ACL | Death Other causes | Home moving | Change of diagnosis |
|-------|---------|-------|-----------|-----------|--------------------|-------------|---------------------|
| 2011 | 4 | 197 | 11 | 1 | - | 17 | 1 |
| 2012 | 40 | 380 | 8 | - | - | 37 | 1 |
| 2013 | 32 | 474 | 18 | - | 2 | 20 | 1 |
| 2014 | 13 | 440 | 20 | - | 2 | 14 | - |
| 2015 | 45 | 384 | 29 | - | - | 13 | - |
| Total | 134 | | 86 | 1 | 4 | 101 | 3 |

notifications, staff training, campaign implementation, better sanitary conditions, should be intensified in guidelines of the Ministry of Health, state and municipalities health system.

REFERENCES

1. Brasil MS. Department of Health Surveillance. American Surveillance Leishmaniasis Surveillance Manual. 2 Edn. Brasília. 2010.
2. World Health Organization. Leishmaniasis: the global trend. 2009.
3. Pan American Health Organization - PAHO/WHO. Leishmaniasis Report. 2016.
4. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004; 27: 305-318.
5. National Health Foundation. Epidemiology texts for environmental health surveillance / coordination. Brasília, 2002.
6. Rebelo, José Manuel Macário, Assuncao junior, Antonildes Nascimento, silva, Orleans, et al. Occurrence of sandflies (Diptera, Psychodidae) in outbreaks of leishmaniasis, in an area of ecotourism around Lençóis Maranhenses National Park, Brazil. Cadernos de Saúde Pública. 2010; 26: 195-198.
7. Costa JML. Epidemiology of leishmaniasis in Brazil. Gaz Med Bahia. 2005; 75: 3-17.
8. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in the New World. In L Collier, A Balows, M Sussman. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th Edn. Parasitology. 2005; 313-349.
9. Silveira Ft, Ishikawa Eai, De Souza, Lainson, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. Sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. Parasite. 2002; 9: 43-50.
10. Vergel C, Palacios R, Cadena H. Evidence for *Leishmania (Viannia)* parasites in the skin and blood of patients before and after treatment". J Infect Dis. 2006; 194: 503-511.
11. Silva NS, Muniz VD. Epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in the State of Acre, Brazilian Amazonia. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2009; 25: 1325-1336.
12. Negrão GN, Ferreira ME. Considerations on American Cutaneous Leishmaniasis and its expansion in Brazilian territory. J Applied Mathematics. 2014; 6: 147- 168.
13. Brazilian statistical geography establishment (ibge). Projection of the population of Brazil and of the units of the federation.
14. Brasil MS. American Cutaneous Leishmaniasis - Confirmed cases Notified in the Notification of Injury Information System - Sinan 2011 to 2015. 2017.
15. Batista EA, Vieira VC, Silv AA. Epidemiological profile of cases of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Sarandi. Revista UNINGÁ. 2015; 22: 10-13.
16. França EL. Epidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in the city of Juína, Mato Grosso, Brazil. cientia Medica, Porto Alegre. 2009; 19: 103-107.
17. Oliart-guzmán H. Epidemiological characteristics of American tegumentary leishmaniasis on the Amazon frontier: a retrospective study in Assis Brasil, Acre. Rev Patol Trop. 2013; 42: 187-200.
18. Oliveira rz, Oliveira lz, Lima mvn, Airton pereira de lima1, Lima rb, Silva dg, et al. American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Jussara, state of Paraná, Brazil: historical series of 21 years. Space for Health - Paraná Public Health Magazine. Londrina. 2016; 17: 59-65.

Cite this article

de Almeida JV, Brazil RP (2017) Retrospective Study of Cutaneous Leishmaniasis in The State of Roraima, North of Brazil. J Dermatol Clin Res 5(4): 1108.

Artigo 2. Parasitological and molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis among indians in the State of Roraima, Brazil.

ALMEIDA, Joseneide Viana de et al . Parasitological and molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis among indigenous peoples in the state of Roraima, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 53, e20200006, 2020 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822020000100358&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 09 nov. 2020. Epub 21-Out-2020. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0006-2020>.

No transcorrer do estudo, e ainda mais precisamente na caracterização da população do estudo, verificamos que o estado de Roraima tinha em sua composição populacional, uma parcela importante de pessoas indígenas e daí surgiu a perspectiva de identificar o comportamento da LC entre estes arborígenes. Na revisão da literatura e dos poucos estudos encontrados, percebemos a incidência da LC neste grupo específico no estado, mas no entanto, não encontramos nenhum estudo que demonstrasse as espécies de leishmanias que acometiam estes indígenas. Neste artigo foi discutido alguns aspectos epidemiológicos da LC entre os aborígenes no estado de Roraima, através da análise de dados do SINAN e dos resultados de exame parasitológico e molecular de 30 amostras de pacientes indígenas atendidos no SUS de Roraima no período de 2017 a 2018. No exame parasitológico 70% e na PCR 90% dos casos foram positivos para *Leishmania* spp. respectivamente. O estudo mostra a manutenção do ciclo de transmissão da forma cutânea da LC ao longo do período estudado entre os indígenas de diversas etnias de Roraima e sugere a atividade de lazer (em comunidades aldeadas ou vilas), agricultura, a pesca, caça e a coleta de frutos na floresta, como fatores preditivos importantes para a infecção.

Major Article

Parasitological and molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis among indigenous peoples in the state of Roraima, Brazil.

Joseide Viana de Almeida^[1], Cristian Ferreira de Souza^[2], Isabela de Oliveira Teixeira^[3], Hugo Oswaldo Valdivia^[4], Daniella Castanheira Bartholomeu^[4] and Reginaldo Peçanha Brazil^[2]

[1]. Universidade Estadual de Roraima, Boa Vista, RR, Brasil.

[2]. Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Doenças Parasitárias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[3]. Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[4]. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Abstract

Introduction: We diagnose cases of cutaneous leishmaniasis (CL) among indigenous peoples of the state of Roraima, Brazil, and discuss some aspects of its epidemiology. **Methods:** Skin imprints, and lesion exudate samples collected on filter paper were examined using parasitological and molecular techniques, respectively. **Results:** Of 30 indigenous individuals, representing several ethnic groups, with suspected cases of CL, 27 (90%) tested positive for *Leishmania* spp. by PCR, and 21 (70%) by parasitological microscopy. **Conclusions:** Cutaneous leishmaniasis is indistinctly present among indigenous peoples from different regions of the state of Roraima. Individuals from seven of the ten existing ethnic groups in the state tested positive for CL, demonstrating the need for further investigation of the disease among these ethnic groups.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis. Diagnosis. Indians.

INTRODUCTION

Leishmaniasis are neglected infectious diseases transmitted by the sand fly (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)^{1,2} that occur in the poorest countries among the most vulnerable populations with limited access to health services. Leishmaniasis display worldwide distribution, with most cases occurring in Africa, Asia, and the Americas. In the Americas, leishmaniasis is present in 18 countries, and the most common clinical form is cutaneous leishmaniasis (CL). In addition, mucocutaneous leishmaniasis (MCL) displays chronic progression that may lead to deformities and long-term effects³, while visceral leishmaniasis (VL) is more severe, and often fatal if left untreated. Most cases occur in Brazil, East Africa, and India. An estimated 50,000 to 90,000 new cases of VL occur worldwide


annually, with only 25 to 45% reported to the WHO. Visceral leishmaniasis remains one of the most prevalent parasitic diseases, with outbreaks and potential mortality⁴. In South America, Brazil is one of most endemic regions for VL and CL⁵.

In the Brazilian Health System (SUS – Sistema Único de Saúde), leishmaniasis represents a complex of diseases with clinical aspects and epidemiological diversity that need to be better studied, and that are considered to be a major public health problem⁶. The incidence of CL has been increasing in recent years, with an average of 35,000 cases/year distributed from the southern Amazon Basin to the southernmost point of the country^{7,8,9} taking the form of epidemic outbreaks due to forest clearing, logging, and human activities linked to agriculture and leisure¹⁰.

In the Americas, visceral leishmaniasis (LV) is caused by *Leishmania infantum*, but the cutaneous form can be caused by at least 12 species of *Leishmania* that infect humans and animals. In Brazil, seven species of the genus *Leishmania* have been identified. Six of these belong to the subgenus *Viannia*, and one to the subgenus *Leishmania*¹¹.

Corresponding author: Reginaldo Peçanha Brazil.

e-mail: brazil.reginaldo@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0001-8651-7497>

Received 14 April 2020

Accepted 5 August 2020

The State of Roraima is included within an area of the Amazon rainforest that overlaps nine Brazilian states. These states belong to the northern region, with municipalities that cover large, difficult to access territories, and are unable to adopt measures recommended by the MoH to control the spread of CL. Indigenous communities appear to be especially vulnerable, because they occupy highly endemic areas for CL with limited access to health services¹².

The state of Roraima exists within this region and fits the scenario described above that we planned to study. has been suffering profound environmental changes in recent years, including occupation of forest areas, and plowing for mining, agriculture, and raising livestock. These environmental disturbances may be contributing to maintenance of the leishmaniasis cycle in this state. A recent study describes the epidemiological profile of CL in the state of Roraima between 2007 and 2016¹³, which shows a 13% incidence of CL among indigenous populations, demonstrating a need for further studies to understand the endemicity among these specific populations in the state.

METHODS

Study area and populations

Roraima obtained statehood in 1988, and covers an area of 225,116.1 km, bordered on the north by Guyana and the Republic of Venezuela, on the south by the states of Amazonas and Pará, on the east by the Cooperative Republic of Guyana; and on the west by the State of Amazonas and the Republic of Venezuela. The total length of international border spans 1922 km¹⁴. In 2019, Roraima had an estimated population of 605,761 inhabitants, factoring in estimated Venezuelan migration¹⁵. According to data from the Roraima Indigenous Council (CIR)¹⁶ in 2017, the state's indigenous population was 53,990 people Yanomami (which has the largest estimated population, at 25,700 people), Ingarikó, Taurepang, Macuxi,

Waimiri-Atroari, Wapixana, Wawai, Yekuana, Patamona, and Sapará. Also according to the CIR, the indigenous population comprises 33 communities: Ananás, Anaro, Aningal, Anta, Araçá, Arapua, Barata, Livramento, Bom Jesus, Boqueirão, Cajueiro, Canaunim, Jabuti, Jacamim, Malacacheta, Mangueira, Manoa/Pium, Moskow, Muriru, Ouro, Pium, Ponta da Serra, Raimundão, Raposa Serra do Sol, Santa Inez, São Marcos, Serra da Moça, Sucuba, Tabalascada, Trombetas/Mapuera, Truaru, Waimiri-Atroari, Wai-wai and Yanomami. The health care of these peoples is the designated responsibility of SESAI - RR, which is represented by two DSEIS systems in Roraima: DSEI Yanomami, and DSEI East^{17,18} (Figure 1).

Collection of data from SINAN and samples

An epidemiological survey of cutaneous leishmaniasis was conducted among the indigenous populations of Roraima, through retrospective analysis of cases reported in Sinan from 2013 to 2017¹⁹. From 2017 to 2018, samples were collected (by lesion scarification) for parasitological examination. Concomitantly, samples of scraped material were collected on filter paper (FTA® cards) for further characterization of *Leishmania* species by molecular tools.

Parasitological Examination

Direct examination was performed by specimen collection from the edge of the ulcerated lesion (scarification) using aseptic technique with a lancet and/or a sterile scalpel. The collected material was smeared on slides, fixed with metanol, and stained with Giemsa and/or Panotic. Slides were observed by optical microscopy at 100X magnification.

Molecular Detection

Samples of cells, tissues, and blood collected from lesion scarification of each patient with suspected LT were identified and subjected to DNA extraction using a Genra Puregene® Cell and

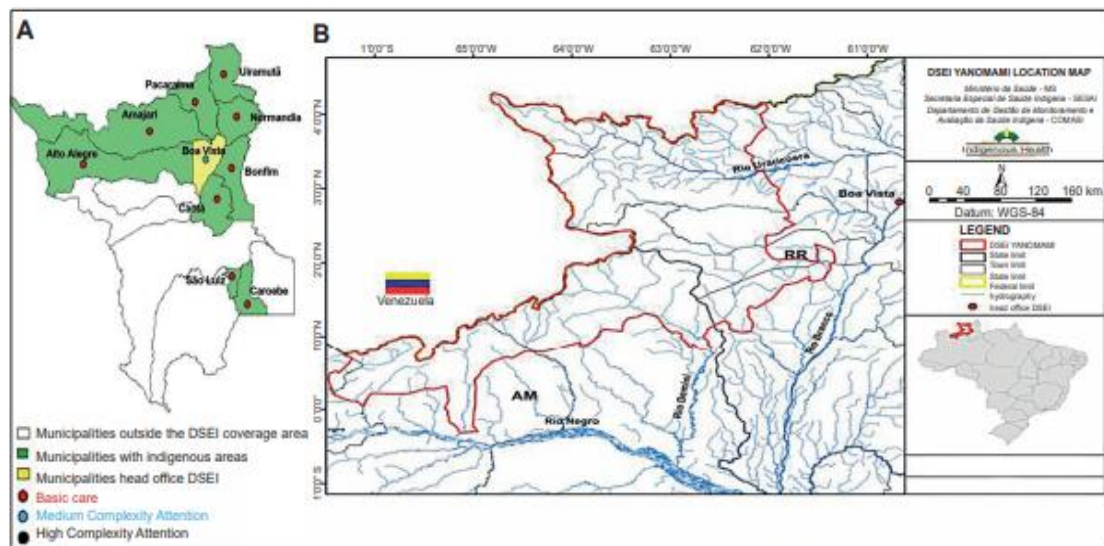


FIGURE 1: DSEIs of Roraima. A: Map of the state of Roraima with municipalities covered by DSEI East, and B: Map location of DSEI Yanomami. Source: Fig. A: FUNASA¹⁷, 2010; Fig. B: BRAZIL, 2017¹⁸.

Tissue Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol.

The presence of *Leishmania* DNA was detected by PCR using subgenus-specific primers that target *Leishmania* or *Viannia* minicircle-kinetoplast (kDNA) DNA (Table 1). Species within each subgenus will be defined in due course by sequencing positive material obtained by PCR.

PCR reactions were performed in a total volume of 20 µL, containing 1X GoTaq green buffer (Promega), 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM of each primer, 1 U of DNA Taq polymerase (Phoentria) and 1 or 5 µL of DNA. PCR reactions templated with samples on filter paper were performed in two stages. Initially, samples were analyzed in 5 patient pools with primers specific to the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. In this initial screen, 5 µL of each pool was used per PCR reaction. Subsequently, individual DNA samples from patients in each positive pool were subjected to PCR using subgenus *Leishmania* and *Viannia* primers. Thermal cycle conditions consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 min; followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 56°C for subgenus *Leishmania*, and 60°C for subgenus *Viannia* for 30 s, and extension at 72°C for 30 s; followed by a final extension step at 72°C for 7 min. Expected band size for each reaction is indicated in Table 1. The amplified products were analyzed by electrophoresis in 2.0% agarose gels in 1x TAE buffer containing 0.5 µg/mL ethidium bromide, and visualized under UV light using ImageQuant LAS 4000 (GE Health Life Sciences).

Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Roraima under CAAE 57445116.3.0000.5302.

RESULTS

During the study period, 313 confirmed cases of CL among indigenous people in the state of Roraima were reported by SINAN¹⁹. The year 2016²⁰ had the lowest number of cases, although levels were similar in other years, except for 2015, in which 94 cases were reported (Table 2). From 2016 to 2018, 30 samples were collected from the study population for parasitological examination and molecular diagnosis. Twenty one (70%) were positive, and 9 (30%) were negative. Twenty seven (90%) of these PCR-kDNA samples for *Leishmania* species of the subgenus *Viannia* were positive (Table 3). All samples were negative for the subgenus *Leishmania*. All patients developed the cutaneous form, and presented with the following distribution of numbers of lesions:

22 (73%) patients had a single lesion, 8 (27%) had two or more lesions distributed throughout the body. Twenty two (73%) of the CL patients were male, and 8 (27%) were female (Table 3).

Table 3 displays an evaluation of patient data by age group and year. The highest percentage of cases occurred in patients aged 21-30 years (26.67%) followed by the 31-40 year old cohort (16.67%).

The ethnic distribution of kDNA examination subjects was as follows: 11 (40.74%) patients were Ianomami, 4 (14.81%) Sanumã, 5 (18.52%) Macuxi, 3 (11.11%) Yekuana, 2 (7.4%) Xiriana, 1 (3.7%) Wai-wai and 1 (3.7%) Igaricó. Ianomami and Macuxi people are more numerous in the state according to the Roraima Indian Council¹⁶, and thus have more individuals at risk of contracting CL.

Regarding the distribution of cases by municipality (Figure 1), we noticed that almost all cases concentrate in the municipalities of Uiramutã, Alto Alegre and Amajari, validating these results because these municipalities harbor the largest indigenous populations in the state.

DISCUSSION

The results of this research are similar to data from a study on the distribution of cutaneous leishmaniasis cases in the municipality of Rio Preto da Eva, in the state of Amazonas²¹. However, these results are superior to the results obtained in characterization of *Leishmania* species in biological CL samples from patients in Brasília in the state of Acre²², where samples analyzed by PCR-kDNA were able to detect *Leishmania* DNA in 66.6% of patients.

Our results are consistent with case data from the general population published by the State Secretariat of Health of Roraima²³ and the latest figures presented in reports

on the distribution of CL in the Americas up to 2019¹. The high incidence of CL in males has been attributed to their increased contact with forest regions, during excursions into the forest to work and/or for leisure activities. The low incidence in females may be related to peridomestic and intradomestic transmission⁶. In the specific case of indigenous people, who, despite growing numbers of individuals changing their normal activities, maintain their lifestyle of exploring the forest in a "coivara" system, hunting, fishing, and gathering. This way of life results in a unique daily dynamic, characterized by daily forays into forest areas, capociras, fields, igapós, and streams²⁴, which may favor transmission of the parasites responsible for CL.

TABLE 1: Primers used in PCR reactions with their respective sequences and amplicon sizes.

| Target | Primer | Sequence | Amplicon Size |
|----------------------------|--------------|----------------------------|---------------|
| Subgenus <i>Leishmania</i> | kDNA.Leish.F | 5'CGTGGGGGAGGGCGTTCT 3' | 135 bp |
| | kDNA.Leish.R | 5'CCGAAGCAGCCGCCCTATT 3' | |
| Subgenus <i>Viannia</i> | MP1L | 5' TACTCCCCGACATGCCTCTG 3' | 70 bp |
| | MP3H | 5' GAACGGGGTTTCTGTATGC 3' | |

Source: Adapted from Cardoso *et al* 2019⁵.

The large number of CL cases in the age groups spanning 20-40 years is due to this group providing the largest proportion of the active work force in the field for hunting and fishing. Theoretically, these people are most exposed to the sand fly vector, while the lowest infection rates are seen in people above this age range that do not frequently participate in such activities. It is also noteworthy that CL cases occur among the age group between 7 months and 10 years, which is suggestive of intradomiciliary or peridomiciliary transmission among indigenous people who live in their own homes on small properties, such as the Macuxi, who live in small existing houses within the indigenous area, and attend schools located in their own territory. Transmission of CL among indigenous peoples living in the forested areas of Roraima suggests that these young people and children are being taken by their guardians to work areas, or are participating in hunting and fishing, where they are

TABLE 2: Distribution of LC cases among indigenous peoples in Roraima, Brazil, from 2013 to 2017.

| Year | Number of Cases |
|--------------|-----------------|
| 2013 | 60 |
| 2014 | 59 |
| 2015 | 94 |
| 2016 | 49 |
| 2017 | 51 |
| Total | 313 |

Source: SINAN 2019.

TABLE 3: Demographics of LC cases among indigenous peoples, and diagnostic results of samples collected on PCR filter paper and slide imprints for microscopic examination in Roraima, Brazil, from 2016 to 2018.

| Variables | Patients | Sampling | Number of Lesions | | Results | |
|-------------|----------|----------|-------------------|-------------|------------------------|----------------------|
| | | | One | Two or More | Positive by Microscopy | Positive for KDNA ** |
| Gender | Male | 22 | 15 | 7 | 15 | 20 |
| | Female | 8 | 7 | 1 | 6 | 7 |
| Age | 0 a 10 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 |
| | 11 à 20 | 10 | 7 | 3 | 5 | 9 |
| | 21 à 30 | 8 | 5 | 2 | 7 | 9 |
| | 31 à 40 | 5 | 3 | 3 | 5 | 3 |
| | 41 à 50 | 3 | 3 | 0 | 1 | 2 |
| | 51 e + | 2 | 2 | 0 | 1 | 2 |
| Ethnicities | Ianomami | 11 | 8 | 3 | 11 | 11 |
| | Sanumã | 4 | 3 | 1 | 2 | 4 |
| | Macuxi | 5 | 3 | 2 | 4 | 5 |
| | Yekuana | 4 | 3 | 1 | 1 | 3 |
| | Xiriana | 3 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| | Waiwai | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| | Igaricó | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 |

** . Positive samples for presence of KDNA with L. Viannia MP1L - F Primer and MP3H - R KDNA. Amplicon: 70bp.

exposed to phlebotomine, and can then be infected by CL causing parasites, as has been reported in a study of a region of Brasília in Acre²², where phlebotomine exposure was associated with CL transmission among people living in rural areas and working in rubber extraction.

It is noteworthy that a number of cases were found in Boa Vista, despite a report from the State Department of Health (2018)²³ indicating that Boa Vista has no record of autonomous cases of CL. This discrepancy may suggest that some indigenous people are moving to the state capital for CL diagnosis and treatment. We also note that the municipality of Caroebe, located in the extreme south of the state on the border with Pará State, and the municipality of Pacaraima located in the extreme north of the state, bordering

Venezuela, also reported cases of CL, demonstrating that the endemic disease is indistinctly present among indigenous peoples in all municipalities within the state where these peoples live.

The State of Roraima, specifically among indigenous communities, has factors favorable to disease endemicity, necessitating further studies, focused on the transmission cycle, vectors, hosts, measures for prevention and control of LC in young people, and actions based on effective public policies for control of LC in Roraima.

Financial support

National Council for Scientific and Technological Development – CNPq and Dinter BP/FIOCRUZ/UFRR.

AUTHORS' CONTRIBUTION

JVA: Conception and design of the study, data acquisition, data analysis and interpretation, drafting the article; **CFS:** Data acquisition, data analysis and interpretation; **IOT:** Data acquisition, data analysis and interpretation; **HOV:** Data acquisition, data analysis and interpretation; **DCB:** Data acquisition, data analysis and interpretation; **RPB:** Study conception and design, drafting the article, final approval of the version submitted.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Organização Panamericana da Saúde (OPAS). Informe Leishmanioses das Américas N° 7 – março de 2019. Accessed in September 2019. Available from: <https://www.paho.org/en>
2. Brazil RP, Rodrigues AAF, Filho JDA. Sand Fly Vectors of Leishmania in the Americas. *Entomol Ornithol Herpetol.* 2015;4:e144.
3. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis [cited 3 Set. 2019] [Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>].
4. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Key Facts (Internet). 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/details/leishmaniasis>
5. Cardoso MS, Bento GA, Almeida LV, Castro JC, Reis-Cunha JL, Barbosa VA, et al. Detection of multiple circulating Leishmania species in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Governador Valadares, southeastern Brazil. *PLoS One.* 2019;14(2):e0211831.
6. Almeida JV, Brazil RP. Retrospective Study of Cutaneous Leishmaniasis in The State of Roraima, North of Brazil. *J Dermatolog Clin Res.* 2017;5(4):e1108.
7. Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305-18.
8. Fundação Nacional de Saúde (Brasil). Textos de Epidemiologia para vigilância ambiental em saúde/coordenação. Brasília, 2002.
9. Rebello JMM, Júnior ANA, Silva O, Moraes JLP. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de leishmanioses, em área de ecoturismo do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2010;26(1):195-8.
10. Costa JML. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. *Gaz Med Bahia.* 2005;75(1):3-17.
11. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 3ª ed. Brasília: MS, 2017. 30p.
12. Athias R, Machado MA. Saúde indígena no processo de implantação dos Distritos Sanitários: temas críticos e propostas para um diálogo interdisciplinar. *Cad Saúde Pública.* 2001;17(2):425-31.
13. Pezente LG, Benedetti MSG. Perfil epidemiológico da leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Roraima, Amazônia, Brasil, entre 2007 e 2016. *Braz J Hea Ver.* 2019;2(3):1734-42.
14. Nascimento J. & Rodrigues M. (28 de Outubro de 2003). Análise da atuação dos Conselhos Municipais de Saúde dos Municípios de Amajari e Pacaraima no período de 2001 a 2003. Boa Vista, Roraima, Brasil: Fiocruz.
15. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estimativa populacional do Estado de Roraima, 2019. Accessed in September 2019.
16. Conselho Indígena de Roraima (CIR). População estimada de indígenas em Roraima no ano de 2017. Available from: <https://folhabv.com.br/noticia/Poucos-mais-de-11-dos-7-roraimenses-se-declaram-indigenas-o-maior-percentual-do-pais/27578> Accessed in: 2019 Sept 20.
17. Fundação Nacional de Saúde, Coordenação Regional de Roraima(FUNASA). Caracterização e Estágio da Implantação dos Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEI). Distrito sanitário especial do leste de Roraima. 2012. Available from <http://www.bvsde.paho.org/bvsapi/p/fulldtext/distritos/leste.pdf>
18. Ministério da Saúde. Mapa de Localização do DSEI Yanomami, 2017. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br>. Accessed in 2019 Sept 20.
19. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN 2013 a 2017. Accessed in September 2019.
20. Secretaria de Estado da Saúde de Roraima (SESAU – RR). Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima 2016.
21. Figueira LP, Soares FV, Naiff MFS, Silva SS, Espir TT, Pinheiro FG, et al. Distribution of cases of cutaneous leishmaniasis in the city of Rio Preto da Eva, Amazonas, Brazil. *Rev Pat Trop.* 2014;43(2):173-81.
22. Pereira TA, Pita-Pereira D, Barbosa RM, Silva TG, Duarte MPO, Brazil RP, et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Acre State in the Amazonian Region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018;51(3):376-81.
23. Secretaria de Estado da Saúde de Roraima (SESAU – RR). Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima 2018.
24. Moreno ES, Cabral JO, Freire MP, Costa AS, Costa TS, Souto RNP, et al. Leishmaniose tegumentar entre indígenas na Amazônia. *Vigil Sanit Deb.* 2016;4(4):51-9.



OPEN ACCESS
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Artigo 3. Diagnosis and characterization of *Leishmania* species in patients with cutaneous leishmaniasis in the state of Roraima, Brazil's Amazon Region.

Joseneide Viana de Almeida , Cristian Ferreira de Souza, Andressa Alencastre Fuzari, Christie A. Joya, Hugo O. Valdivia, Daniella Castanheira Bartholomeu, Reginaldo Peçanha Brazil.

Artigo submetido ao periódico *Parasites & Vectors*, aguardando o aceite para publicação.

Estudos anteriores ao nosso, deixaram à tona questionamentos sobre especificidade parasitária das espécies de LC que estavam acometendo as pessoas no estado. O presente estudo se propôs a caracterizar as espécies de *Leishmania* spp. circulantes entre humanos em amostras isoladas de pacientes com leishmaniose cutânea em áreas endêmicas do Estado de Roraima no período de 2016 a 2018. Foram coletadas 262 amostras de pacientes com suspeita clínica de LT e submetidas ao exame parasitológico direto (PDL) e caracterização molecular por PCR/Sequenciamento. Das 262 amostras, foram selecionadas 76 amostras positivas na PCR-ITS-1, que por sequenciamento, conseguiu-se a caracterização de oito espécies diferentes: *L. (V) braziliensis* , *L. (L) amazonensis*, *L.(V) guyanensis* , *L. (V) naiffi*, *L. shawi*, *L.panamensis* , *L. utingensis* , *L. lindenberg*. Esta caracterização epidemiológica de LC é pioneira em revelar as espécies de *Leishmania* circulantes em Roraima por biologia molecular em humanos, e assim, sugere-se mais investigações sobre os vetores, hospedeiros, a incidência da doença, os agentes etiológicos, bem como intensificação de ações de vigilância e controle da LC no estado.

Diagnosis and identification of *Leishmania* species in patients with cutaneous leishmaniasis in the state of Roraima, Brazil's Amazon Region.

Joseneide Viana de Almeida¹, Cristian Ferreira de Souza², Andressa Alencastre Fuzari², Christie A. Joya³, Hugo O. Valdivia³, Daniella Castanheira Bartholomeu⁴, Reginaldo Peçanha Brazil²

[1] Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[2] Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

[3] Department of Parasitology, U.S. Naval Medical Research Unit 6, Lima, Peru.

[4] Departamento de Parasitologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author email: brazil.reginaldo@gmail.com

Joseneide Viana de Almeida - Almeida, JV - jvaenf@yahoo.com.br - <https://orcid.org/0000-0002-0900-8813>

Cristian Ferreira de Souza - Souza, CF - biominas2004@yahoo.com.br - <https://orcid.org/0000-0003-4274-3278>

Andressa Alencastre Fuzari - Fuzari, AA - andressafuzari@gmail.com - <https://orcid.org/0000-0001-5187-6684>

Christie A Joya - Joya CA - christie.a.joya.mil@mail.mi - <https://orcid.org/0000-0003-1087-138X>

Hugo O. Valdivia - Valdivia, HO - hugo.o.valdivia.fn@mail.mil - <https://orcid.org/0000-0003-2159-5667>

Daniella Castanheira Bartholomeu - Bartholomeu, DC - daniella@icb.ufmg.br - <https://orcid.org/0000-0003-0974-7357>

Reginaldo Peçanha Brazil - Brazil, RP - brazil.reginaldo@gmail.com - <https://orcid.org/0001-8651-7497>

ABSTRACT

Background: Cutaneous leishmaniasis (CL) is an endemic disease in Brazil that is highly prevalent in the northern region of the country. Although there is a continuous and growing number of cases registered in the state of Roraima, there is limited information regarding the species of *Leishmania* that affect the human population. In this study, we aimed to characterize which *Leishmania* species cause human disease in those presenting with cutaneous leishmaniasis in endemic areas of the State of Roraima. **Methods:** We conducted a prospective surveillance study between 2016 to 2018 in health centers located in the State of Roraima, Brazil. Participants with clinical suspicion of CL were enrolled and provided lesion samples for parasitological detection by microscopy. A subset of the samples was tested by polymerase chain reaction and sequencing of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1 PCR) for molecular species identification.

Results: A total of 262 participants were enrolled in this study. Out of those, 129 (49.27%) were positive by parasitological examination. Most positive subjects (81.58%) were male and the majority of cases presented a single lesion (80.26%). ITS-1 PCR and sequencing on a subset of 76 samples allowed us to detect nine different species of *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L.(V.) ubingensis*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) mexicana*.

Conclusions: Our study provides the first assessment of circulating species of *Leishmania* in the State of Roraima, Brazil and showed the high diversity in this region. This study opens the path for further research on the transmission of leishmaniasis in the northernmost Brazilian State including vector and reservoir surveillance as well as for intensification of investigation and control activities against CL in the region.

Key word: Cutaneous Leishmaniasis, *Leishmania* spp., Molecular diagnosis, PCR.

Author details

[1] Programa de Pós-Graduação em Biologia parasitária, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ Brasil; Universidade Estadual de Roraima, Boa Vista, Roraima.

JVA: jvaenf@yahoo.com.br

[2] Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CFS: biominas2004@yahoo.com.br

AAF: andressafuzari@gmail.com

RPB: brazil.reginaldo@gmail.com

[3] Department of Parasitology, U.S. Naval Medical Research Unit 6, Lima, Peru.

CAJ : christie.a.joya.mil@mail.mil

HOV : hugo.o.valdivia.ln@mail.mil

[5] Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

DCB: daniella@icb.ufmg.br

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by species of intracellular protozoa, morphologically similar, of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and transmitted by the bite of infected female sand flies (Diptera: Psychodidae) [1]. The disease is highly prevalent in poor countries and vulnerable populations with limited access to health services [2]. In 2017, 94% of all new cases reported to the WHO occurred in seven countries: Brazil, Ethiopia, India, Kenya, Somalia, South Sudan and Sudan and approximately 90% of mucocutaneous leishmaniasis cases occurred in Bolivia, Brazil and Peru [3].

Leishmaniasis is highly prevalent in the northern region of Brazil where it accounts for a large proportion of cases each year [3]. The Brazilian Amazon is located in this area [3,4] and is comprised of municipalities of large territorial extension and very difficult access. This scenario poses challenges to implement measures recommended by the Brazilian Ministry of Health for the control of CL and is further complicated by the multiple ethnic, cultural and environmental factors that characterize this region [4,5]. Previous studies have shown that Brazil's Amazon region has undergone profound environmental changes resulting from mining, agriculture, and livestock expansion [6], which may be contributing to changes and maintenance of the leishmaniasis cycle in the area. The State of Roraima that is located in this region has experienced these changes with an increase of leishmaniasis cases between 2011 to 2015 [3]. Recorded data on CL cases through the Ministry of Health's Information System for Notifiable Diseases (SINAN) [7] between the years 2008 to 2018 revealed that the average number of cases notified in Roraima was 347,7 cases per year.

Studies describing the epidemiological profile of the disease in Roraima have shown that the majority of reported cases are in men, of working age and migrants involved in activities such as deforestation and occupation of areas such as settlement projects [8]. The predominant clinical form of the disease is cutaneous with one single lesion, and regarding treatment, most of these patients were discharged for healing [3].

In order to understand CL transmission in the State of Roraima, the present study focused on identifying CL human cases in patients from the public health network of Roraima, as well as performing molecular diagnosis by PCR (Polymerase Chain Reaction) and sequencing for *Leishmania* species determination. The results obtained provide information that will help to develop measures for interventions and efficient control strategies for CL in the state.

MATERIAL AND METHODS

Study area

The State of Roraima was created in 1988 and belongs to the North region of Brazil. The state shares borders to the south with the State of Amazonas; to the East with the Republic of Guyana and the State of Pará; and to the West with the State of Amazonas and Venezuela. It has a territorial area of 224,299 km² that is divided into 15 municipalities: Alto Alegre, Amajari, Boa Vista (Capital), Bonfim, Cantá, Caracaraí, Caroebe, Iracema, Mucajaí, Normandy, Pacaraima, Rorainópolis, São João da Baliza, São Luiz and Uiramutã (Figure 1) [9]. The estimated population is 605,761 inhabitants including Venezuelan immigrants [10].

Patient selection and sample collection

The study included patients with suspected CL that were enrolled between 2016 to 2018 at the Reference Laboratory of the Mecejana Health Center and at the Indian Health

House (CASAI) in Boa Vista and different Health Units in the municipalities of Mucajaí, Caroebe (southern region of Roraima state) and Pacaraima on the border with Venezuela. Patients were informed about the research and provided informed consent. A clinical examination was performed in all patients and a questionnaire was administered to collect socioeconomic and demographic data (sex, age group), presence of lesions, previous leishmaniasis episodes and treatment history.

Samples were collected from these patients by scraping of the lesion for microscopy. Remaining tissue was used to prepare filter paper imprints for molecular detection of *Leishmania* species. The study was approved by the ethics committee of the Federal University of Roraima under protocol number CAAE 57445116.3.0000.5302.

Parasitological analysis

Direct examination was performed by collecting tissue at the edge of the ulcerated lesion using an aseptic technique with a lancet and/or sterile scalpel. The material was spread onto microscopy slides, fixed with methanol and stained with Giemsa and/or Panotic. The slides were read using optical microscopy at 100X magnification [1].

Molecular studies

After collecting the samples on filter paper, DNA extraction was performed using the Genra Puregene Tissue Kit (QIAGEN®), following the manufacturer's protocol. PCR of the internal transcribed spacer 1 was performed using primers LITSR (5'CTGGATCATTTTCCGATG3') and L5.8S (5'TGATACCACTTATCGCACTT3') as previously described [11].

The PCR reaction was prepared under the following buffer conditions: 1x buffer solution (200 mM Tris-HCl pH8.4, 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM mixture dNTPs, 0.5 pmol of the LITSR primer, 0.5 pmol of the L5.8S primer, 1 U of Taq Platinum polymerase

DNA (Invitrogen®) and 5 µl of template DNA, in a final volume of 25µL. The amplification reaction was carried out by 33 cycles of denaturation at 95°C for 30sec, annealing at 53°C for 1min and extension at 72°C for 1min in an automatic DNA thermocycler (MaxyGene Gradient - AXYGENE®). The reaction generates a fragment of approximately 350 bp which was analyzed on a 2% agarose gel stained with GelRed™ and compared with controls of *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

PCR positive samples were sent to Macrogen® (Seoul, Korea) for bidirectional Sanger gene sequencing using an automatic sequencer (Applied Biosystems 3730XL). The obtained sequences were aligned and analyzed using the Sequencher®4.1.4 program and subsequently compared by BLAST and deposited in GenBank (sample ID: MT606220 - MT606276). [12]

Data analysis

In order to provide additional confirmation to the species detected by Blast, the resulting fasta sequences were used for discriminant analysis of principal components. Briefly, reference sequences from *L. (V.) panamensis* PSC1, *L. (V.) braziliensis* (LH2215), *L. (L.) amazonensis* (M2269) and *L. (L.) mexicana* (LEM2284) strains were downloaded and aligned with the clinical sequences from our study using Clustal omega[13].

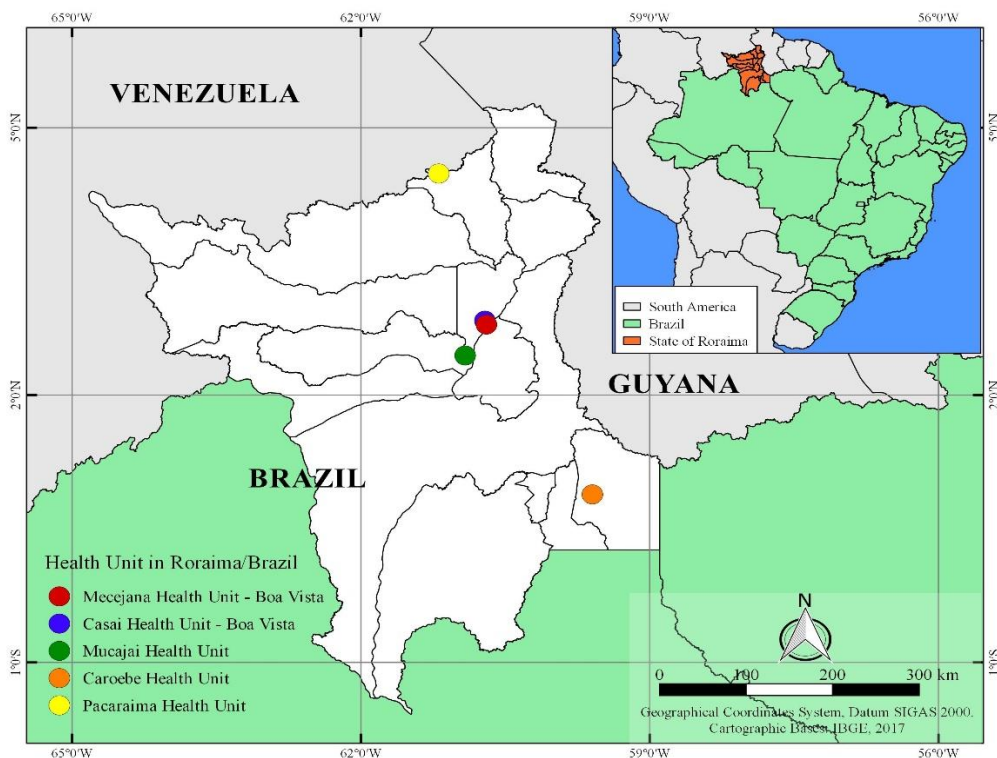
The resulting multiple sequence alignment was loaded into R using the package “ape” [14] and cleaned prior to genetic analysis using the package “poppr” in order to secure that only high quality data remains [15]. The parameter used excluded positions with greater than 30% missing calls. DAPC was performed on the cleaned dataset using the R “adegenet” package[16] Data obtained in the study was organized into a Microsoft Excell 2013® spreadsheet and used for data analysis in GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Due to the categorical nature of the

samples, data was analysed using the ChiSquare Test (χ^2) on BioEstat 5.0 [17] with a significance level of 95% ($\alpha = 0.05$).

RESULTS

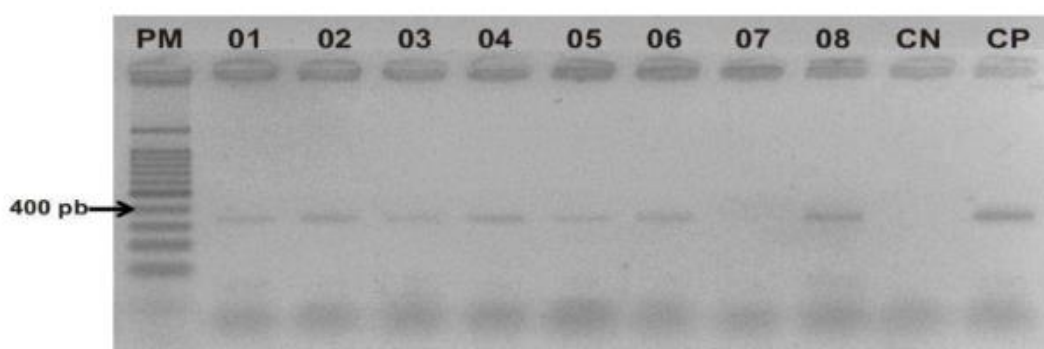
In the period between 2016 and 2018, 262 samples were collected from patients with suspected CL in the municipalities of Boa Vista, Mucajaí, Caroebe, Pacaraima and CASAI in Roraima (Figure 1). Parasitological and PCR tests showed that 129 samples (49.27%) were positive for *Leishmania* sp. (Figure 2). Of these samples, a subset of 76 samples were sent for sequencing.

Figure 1 - Figure 1: Distribution of collection sites according to municipalities of Roraima. The inset shows in the left the number of samples collected as part of this study at each laboratory. The map on the right side shows the location of State and the study sites.



Sequencing results allowed the identification of *Leishmania* species distributed in nine municipalities in the state of Roraima.

Figure 2 - PCR results of *Leishmania* spp. on filter papers of suspected CL patients in Roraima in 2% agarose gel stained with Red gel. PM: base pair marker (100bp); CN: Negative control (pure DNA-free water); CP: positive control of *Leishmania braziliensis* (MHOM / BR / 75 / M2903); 07: negative sample; 01-06 and 08: positive samples.



Out of 76 patients, 67 (88.16%) were from rural areas and 9 (11.84%) from urban settings (Tables 1 and 2). In the analysis regarding the gender distribution, 81.58% (n = 62) of all cases were in men (Table 1). All patients presented the clinical cutaneous form with the following distribution of lesions: 80% (n = 61) with a single lesion, 9% (n = 7) with two lesions and 11% (n = 8) with three or more lesions. In the assessment by age group the highest percentage of cases occurred in patients between 21 to 40 years (60.5%, n = 46). The study detected six of the seven species of *Leishmania* found by the Ministry of Health to cause CL in Brazil. In addition, we also observed the occurrence of *L. (L.) mexicana* and *L. (V) panamensis* (Table 2).

Table 1- Distribution of *Leishmania* species identified in the sequencing of the material obtained by PCR-ITS-1 by sex, age, area of origin and nationality, in the State of Roraima, Brazil, from 2016 to 2018.

| Patient / Variables | | number of samples | 1 injury | 2 injuries | ≥ 3 injuries | DNA (+) | Leishmania species defined in sequencing | | | | | | | | | | |
|------------------------------|------------|-------------------|----------|------------|--------------|---------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|--|
| | | | | | | | L.b | L.a | L.g | L.p | L.s | L.l | L.u | L.sp. | L.n | L.m | |
| Genre | Male | 62 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Feminine | 14 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Age range | 0 a 10 | 4 | 4 | | | 4 | 2 | | | 1 | | | | | 1 | | |
| | 11 à 20 | 6 | 5 | | 1 | 6 | | 2 | | 1 | 2 | | | | 1 | | |
| | 21 à 30 | 18 | 13 | 2 | 3 | 18 | 5 | 4 | | 4 | 1 | 1 | | | 3 | 1 | |
| | 31 à 40 | 28 | 20 | 5 | 2 | 28 | 11 | 4 | 3 | 3 | | | | | 6 | | |
| | 41 à 50 | 13 | 13 | | 1 | 13 | 3 | 3 | | 1 | | | 1 | | 5 | | |
| Area | 51 e+ | 7 | 6 | | 1 | 7 | 2 | 2 | 1 | | | | | | 2 | | |
| | Urban | 9 | 6 | 2 | 1 | 9 | 3 | 2 | | 1 | | | | | 3 | | |
| | Rural | 67 | 56 | 5 | 6 | 67 | 20 | 12 | 4 | 9 | 3 | 1 | 1 | 15 | 1 | 1 | |
| Origin By nationality | Brasil | 71 | 60 | 7 | 7 | 71 | 23 | 14 | 4 | 11 | 3 | 1 | 1 | 13 | 1 | | |
| | Venezuela | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | | | | | | | 2 | | |
| | Guyana | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | | 1 | | | | | | 1 | | |
| | Indigenous | 6 | 3 | 1 | 2 | 6 | 3 | | | 2 | 1 | | | | | | |

Note: L.b = *Leishmania braziliensis*; L. a = *Leishmania amazonensis*; L.g = *Leishmania guyanensis*; L.p = *Leishmania panamensis*; L. s = *Leishmania shawi*; L.l = *Leishmania lindenbergi*; L. u = *Leishmania ubingensis*; L. sp. = *Leishmania sp.*; L.n = *Leishmania naiffi*; L.m = *Leishmania mexicana*.

Table 2 - Distribution of *Leishmania* species identified by OTS1 sequencing according to the municipality of origin of patients.

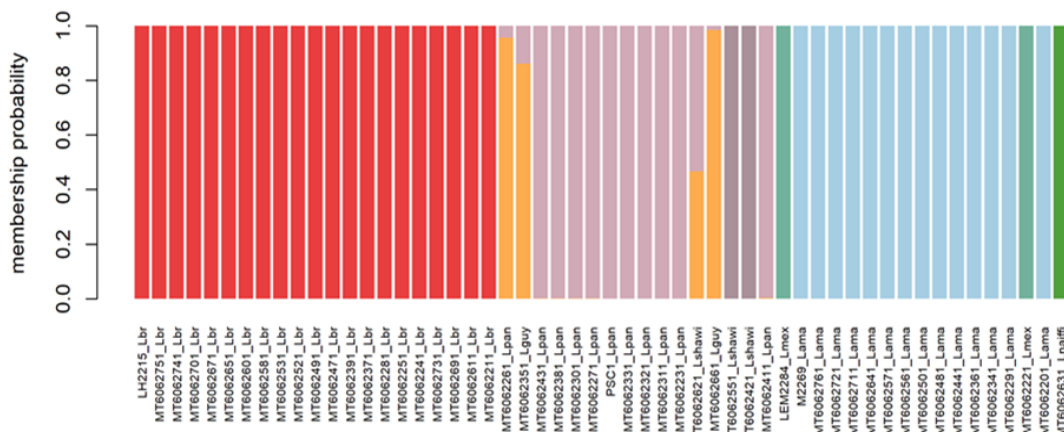
| Municipalities / Country | SPECIES | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------|------|------|------|------|------|------|--------|------|------|
| | L. b | L. a | L. g | L. n | L. s | L. p | L. u | L. sp. | L. l | L. m |
| Boa Vista | 3 | 2 | | | | | | 4 | | |
| Alto Alegre | 7 | | 2 | | | 3 | | | 1 | 1 |
| Cantá | | 5 | | 1 | | | | | | |
| Caroebe | 1 | 1 | 1 | | 2 | | | 4 | | |
| Mucajai | 3 | 1 | | | | | 1 | | | |
| Iracema | 2 | 1 | | | | | | | | |
| São Luiz | | 1 | | | | | | | | |
| Pacaraima | | 1 | | | | 2 | | 4 | | |
| Amajari | 8 | | | | 1 | 5 | | 2 | | |
| Pres. Figueredo - AM | | | | | | | | 1 | | |
| Guyana | | | 1 | | | | | 1 | | |
| Venezuela | | 1 | | | | | | 2 | | |
| TOTAL | 24 | 13 | 4 | 1 | 3 | 10 | 1 | 18 | 1 | 1 |

Note: L.b = *L. braziliensis*; L. a = *L. amazonensis*; L.g = *L. guyanensis*; L.p = *L. panamensis*; L.s = *L. shawi*; L.l = *L. lindenbergi*; L. u = *L. utingensis*; L. sp. = *Leishmania sp.*; L.n = *L. naiffi*; L.m = *Leishmania mexicana*.

The PCA provided further support to the GenBank results and was fully able to cluster most clinical samples with their species reference sequences (Figure 3). In this regard, 9 out of 10 putative *L. (V.) panamensis* samples clustered with the *L. (V.) panamensis* PSC1 reference whereas the remaining sample (MT6062261) clustered with the *L. (V.)*

guyanensis samples. In addition, the *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* clinical samples clustered with their respective reference sequences *L. (L.) mexicana* (LEM2284), *L. (V.) braziliensis* (LH2215), *L. (L.) amazonensis* (M2269). Furthermore, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindernbergi* and *L. (V.) utingensis* presented separate clusters supporting their GenBank identification (Figure 3).

Figure 3: Population structure. The figure shows the population structure of the Leishmania samples collected from Roraima. The avst majority of samples clustered closely to their reference sequences (*L. panamensis* PSC1, *L. braziliensis* LH2215, *L. amazonensis* M2269 and *L. mexicana* LEM2284 strains).



L. (V.) braziliensis was the most frequent species in our samples accounting for 31.6% of the 76 samples (n = 24), followed by *L. (L.) amazonensis* with 17.0% (n = 13), *L. (V.) panamensis* with 13.2% (n = 10), *L. (V.) guyanensis* with 5.3% (n = 4), *L. (V.) shawi* with 3.9% (n = 3) and *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) utingensis*, *L. (V.) lindenbergi* and *L. (L.) mexicana* with 1.31% (n = 1) each. The remaining samples (n=18, 23.7%) presented profiles without specific identification.

Regarding the *Leishmania* species identified in the municipalities of Roraima, we observed that 31.38% (n = 24) were *L. (V.) braziliensis* present in samples from patients in the municipalities of Boa Vista, Alto Alegre, Caroebe, Mucajaí, Iracema and Amajari, (Tab. 2). *L. (L.) amazonensis* was identified, as the second most characterized 11 species in this study in 18.4% (n=14) of the samples, distributed in the municipalities of Cantá, Boa Vista, Alto Alegre, Caroebe, Mucajaí, São Luiz, Amajari and in Venezuela with one case. In 13.15% (n = 10) of the samples, *L. (V.) panamensis* was distributed in the municipalities of Amajari, Pacaraima and Alto Alegre. In 6.57% (n = 5) of the samples *L. (V.) guyanensis* was detected in the municipalities of Alto Alegre, Caroebe and in Guyana. *L. (V.) shawi* was identified in 3.94% (n = 3) of the samples from the municipalities of Caroebe and Amajari. *L. (V.) naiffi*, was identified in a patient sample from the municipality of Cantá, *L. (V.) utingensis* was detected in an individual residing in the municipality of Mucajaí and *L. (V.) lindenbergi* and *L. (L.) mexicana* were detected in Alto Alegre with one case for each species.

DISCUSSION

The study showed that, although most positive cases were from residents in Brazil, we had cases of patients residing in Guyana and Venezuela. In this regard, reports from the health professionals who attended the patients showed that many individuals come from neighbouring countries and cross the border with Brazil in search of diagnosis and treatment.

The study also revealed 6 positive cases in indigenous subjects of different ethnic groups, corroborating the work of Pezente who described the epidemiological profile of CL in the State of Roraima between the years 2007 and 2016 [8]. That study showed an incidence

of CL of 13% in indigenous populations, demonstrating the need for further studies to understand the impact of CL in this population.

In the present study, the majority of patients with clinical suspicion of CL were in people living in rural areas. The rate of positivity for *Leishmania* was higher in males and in the age group between 21 and 40 years old, which represented 60.3% of cases (n = 46). This is an important finding, since this demographic group represents most of the economically active population.

This case profile is similar to those observed in a previous epidemiological study conducted in the state [15] which observed that the majority of cases occurred in people between 31.6 to 34.5 years old [18,19]. The results also demonstrate a predominance of single CL lesions which is in accordance with other studies conducted in the Amazon [19,20] and Pará [21].

Regarding the distribution by municipalities, our study showed that cases were distributed in 9 of the 15 municipalities in the state of Roraima. Although cases covered all the State microregions [9], more than 55% of them were concentrated in the municipalities of the Boa Vista microregion. This could be related to the fact that this microregion has active mining areas and is among the first entry points for immigrants coming from Venezuela. Our GenBank and PCA results provide support for the introduction of *L. (V) panamensis* in Brazil as well as the potential introduction of *L. (L.) mexicana*. The presence of one *L. (V.) panamensis* sample that clustered closer to *L. (V.) guyanensis* requires additional confirmation by other methods such as multilocus sequence typing or next generation sequencing. Furthermore, additional analysis are needed to confirm the finding of *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L.(V) lindernbergi* and *L. (V) utingensis* due to the lack of whole genomes or reference sequences from these species.

A subset of sequenced samples (n=18) were not identified to the species level and remained as *Leishmania* sp. These sequences presented a low quality, which limited subsequent alignment, blast and PCA analysis.

Our study showed that most cases were due to *L. (V.) braziliensis* which was identified in 31.6% (n= 24) of the samples. In Brazil, this species is the main causative agent of CL with a recent report of expansion in the Amazon [22, 23]. Our findings suggests that this species may be circulating and causing the disease in all municipalities in the State, as it was identified in at least one municipality in each micro-region. This assumption is supported by a previous study on phlebotomine fauna in the municipality of Caroebe [24] on the southern of the state where *Lutzomyia davisi* was the most abundant species in the primary forest. This sand fly species has been found naturally infected with *L. (V.) braziliensis* in several locations in the Brazilian Amazon [25].

L. (L.) amazonensis was the second most identified species and was detected in the municipalities of Boa Vista, Alto Alegre, Cantá, Caroebe, Mucajaí, São Luiz, Amajari and Venezuela. Previous studies conducted in the State of Acre [22] and in the Amazonas State [19]. This species has an important role in public health, since it is associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL), which induces anergy in the individual's immune cell response. In addition, there have been reports of mucosal cases caused by this parasite species [26,1]. The presence of *Lutzomyia flaviscutelata*, in Serra do Tepequém of the Municipality of Amajari [5] reinforce the transmission of *L. (L.) amazonensis* in this region as observed in the Brazilian Amazon [27].

In the case of *L. (V.) guyanensis*, there are previous reports of the presence of its vector, *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis*, in Serra do Tepequém in Amajari [5] and it is known that this species has a wide distribution in areas of primary forest in the Amazon Region.

Although infrequent, the occurrence of *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* in Serra do Tepequém should be a warning sign, since contact with this species in forest areas generally results in the transmission of *Leishmania (V.) guyanensis* to humans.

The presence of *L. (V.) guyanensis* in samples in the cities of Alto Alegre, Caroebe and in Guyana, supports this finding and demonstrates that this species may be circulating on a larger scale in the state. Clinically, individuals affected by this species may present single or multiple lesions, the latter been more frequently due to several vector bites or lymphatic metastases, with the possibility of lymphangitis [28]. This species was also identified in mucosal lesions in the state of Rondônia [29] expanding the possibility of mucosal clinical presentation.

Our study reports for the first time the presence of *L. (V.) panamensis* in Roraima with the detection in the municipalities of Alto Alegre, Pacaraima and Amajari, located in the northern region of the state. *L. (V.) panamensis* is the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in Panama [30] and Colombia and is responsible for a relatively large number of cases in other neighboring countries with records of approximately 3,000 new cases per year [31].

We also detected the presence of *L. (V.) shawi* in two human cases. This species was detected in monkeys from the species *Cebus appela* and *Chiropotes satanus*, sloths *Choloepus didactylus* and *Bradypus tridactylus*, procyonid *Nasua nasua* and in the sand fly *Lutzomyia whitmani*, all of them from primary forest areas of the State of Pará [32].

The presence of *L. (V.) naiffi* in human CL cases in Roraima complements previous reports from the States of Amazonas [33,35] and Pará [34] which indicates that this species is not uncommon in the region.

Two other species of *Leishmania* that were detected in this study were *L. (V.) utingensis* and *L. (V.) lindenbergi* that accounted for one case each. *L. (V.) utingensis* was first reported in 1977 from an infected *Lutzomyia tuberculata* from the Brazilian State of Pará [36]. The scarcity of data on this species as causative CL agent in humans underscores the need of further research to characterize this species.

L. (V.) lindenbergi was reported in soldiers deployed in forested areas in the City of Belém of the Brazilian State of Pará [37] and more recently two CL cases in the state of Rondonia [38]. In the study, we also observed the occurrence of *Leishmania (L.) mexicana* which is a species commonly found in Central America and in the northern region of South America [26].

Conclusions

We provide evidence that several *Leishmania* species are present in the State of Roraima infecting local peoples as well as foreign and Brazilian migrants that are circulating not only in the state but also in the Amazon region. These results are important and open an opportunity for additional research related to disease incidence, treatment responses, circulating reservoirs and vectors which are key components for the development of effective control programs.

Abbreviations

LC: cutaneous leishmaniasis; SINAN: information system for notification of complaints; PCR: polymerase chain reaction; WHO: world health organization; MS: Ministry of Health; PDL: direct parasitological examination; CASAI: Indian health home; LCD: diffuse cutaneous leishmaniasis.

Acknowledgements

We would like to thank the Health Centers Mecejana, Casai (indigenous health home of Roraima) in the municipality of Boa Vista and the health centers in the municipalities of Caroebe, Pacaraima and Mucajaí that treated patients with suspected leishmaniasis and these patients agreed to be included in the study.

Authors' contribution

JVA and RPB: Conceptualized the study, data acquisition, analysis and interpretation of data., JVA, RPB and CFS wrote original draft of the manuscript. JVA, CFS and AAF: Performed the investigation, analysis and interpretation of data. RPB provided supervision and validate the study. CAJ, HOV and DCB provide resources and reviewed the English. All authors assisted visualization of the study, read and approved the final manuscript.

Disclaimer

The views expressed in this article are those of the authors and do not necessarily reflect the official policy or position of the Department of the Navy, Department of Defense, nor the U.S. Government.

Copyright

Several authors of this paper are employees of the U.S. Government. This work was prepared as part of their official duties. Title 17 U.S.C. §105 provides that 'Copyright protection under this title is not available for any work of the United States Government.' Title 17 U.S.C. §101 defines a U.S. Government work as a work prepared by a military service member or employee of the U.S. Government as part of that person's official duties.

Funding

This work was funded by CAPES through the DINTER in Parasitic Biology at UFRR with FIOCRUZ. Aid No. 1647/2018. Case number: 23038.013815 / 2018-64. This work was supported by the US DoD Armed Forces Health Surveillance Branch and its Global Emerging Infections Surveillance section (AFHSB/GEIS), PROMIS ID P0143_19_N6_03, 2019-2020.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study is included in this article and its additional file. Raw data are available upon request to the corresponding author.

Ethical approval and consent to participate

The study was approved by the ethics committee of the Federal University of Roraima under the number CAAE 57445116.3.0000.5302. All patients signed an informed consent form.

Consent for publication

Not applicable.

Competitive interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Laboratório de Ciência e Saúde, Universidade Estadual de Roraima, Boa Vista, RR, Brazil

²Laboratorio de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³Department of Parasitology, U.S. Naval Medical Research Unit 6, Lima, Peru.

⁴Departamento de Parasitologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

REFERENCES

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília:2017.189p.
2. WHO. Leishmaniasis: Epidemiological situation. World Health Organization. Available in <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Access in march 2020.
3. Almeida JV, Brazil RP. Retrospective Study of Cutaneous Leishmaniasis in The State of Roraima, North of Brazil, Journal of Dermatology and Clinical Research, 2017.
4. Negrão GN, Ferreira MEM. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. Revista Percurso NEMO. 2014;1(6):147-168.
5. Athias R, Machado MA. Saúde indígena no processo de implantação dos Distritos Sanitários: temas críticos e propostas para um diálogo interdisciplinar. Cad. Saúde Pública. 2001;17(2):425-31.
6. Gama Neto JL, Baima JM, Freitas RA, Passos MAB. Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) da Serra do Tepequém, Município de Amajari, Estado de Roraima, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. 2010;1(2):131-6.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana – Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação-SINAN EM Roraima entre os anos 2016 a 2018. Available in www.saude.gov.br.
- A8. Pezente LG, Benedetti MSG. Perfil epidemiológico da leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Roraima, Amazônia, Brasil, entre 2007 e 2016. Braz. J. Hea. Rev. 2019; 2 (3): 1734-1742. ccess in august 2020.

9. Brasil. Constituição de 1988. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília: Supremo Tribunal Federal, Secretaria de Documentação, 2019. 577 p. Atualizada até a EC n. 105/2019. ISBN: 978-85-54223-41-0. Available in www.stf.jus.br/arquivo/cms/legislacaoConstituicao/anexo/CF.pde - Accessed in september 2019.
10. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativa populacional do Estado de Roraima, 2019. Available in <https://www.ibge.gov.br/pt/inicio.html>. Accessed in september 2019.
11. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. Diagnóstico por PCR e caracterização de *Leishmania* em amostras clínicas locais e importadas. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47: 349-58.
12. GenBank. International Nucleotide Sequence Database. Available in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Accessed in june 2020.
13. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011;7(539)1-6.
14. Paradis E, Schliep K. Ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*. 2019;35(3):526-528.
15. Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*. 2014;2:e281.
16. Jombart T. Aegenet: um pacote R para a análise multivariada de marcadores genéticos. *Bioinformática*. 2008;24(11):1403-1405.

17. BioEstat 5.0. Download de Arquivos. Available in <http://www.mamiraua.org.br/download/index.php?dirpath=./BioEstat%20%20Portugues&order=0>. Accessed in september 2019.
18. Sampaio RNR, Gonçalves MC, Leite VA, França BV, Santos G, Carvalho MSL et al. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009;42(6):686-690.
19. Coelho LIC, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, et al. Characterization of *Leishmania* spp. Causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil *Parasitol Res*. 2011; 108:671–677.
20. Naiff Júnior RD, Pinheiro FG, Naiff MF, Souza IS, Castro LM, Menezes MP, et al. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. 2009; 38: 103-104.
21. Bacha HA, Tuon FF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, Oliveira J, Nicodemo AC, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identificação por PCR no estado do Pará, Brasil, *Transações da Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011; 105(3):173-178.
22. Araujo-Pereira T, Pereira DP, Moreira RB, Galdino TS, Duarte MPO, Brazil RP et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Acre State in the Amazonian Region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018; 51(3):376-381.
23. Da Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health*. 2006;11(9):1388–98.
24. Gama Neto JL, Baima JM, Freitas RA, Passos MAB. Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) em floresta preservada e alterada do Município de Caroebe, Estado de Roraima, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2012; 3(2):41-46.

25. Souza AAA, Silveira FT, Lainson R, Barata IR, Silva MGS, Lima JAN. Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010;1(1):45-51.
26. Barral A, Pedral-Sampaio D, Junior. GG, Moem H, McMahon-Pratt D, Jesus AR et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 44:536–546.
27. Lainson R, Shaw JJ. Taxonomy of the New World *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1972;66(6):943-4.
28. Lainson R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010; 1(2):13-32.
29. Guerra JAdO, Prestes SR, Silveira H, Coelho LidARC, Gama P, Moura A, et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e980.
30. Vásquez A, Paz H, Alvar J, Pérez D, Hernández C. Informe Final: Estudos Sobre a Epidemiologia da Leishmaniose na Parte Ocidental da República do Panamá. Instituto Comemorativo Gorgas de Estúdio da Saúde; Ministério da Saúde. 1998.
31. Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. Epidemiologia e controle da leishmaniose nos países andinos. *Cafajeste. Saude Publica*. 2000; 16:925–50.
32. Lainson R, Braga RR, Souza AA, Pova MM, Ishikawa EA, Silveira FT. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1989;64(3):200-7.

33. Figueira LP, Zanotti M, Pinheiro FG, Franco AMR. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 41(5):512-514.
34. Lainson, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2010;1(2): 13-32
35. Fagundes-Silva GA, Romero GAS, Cupolillo E, Yamashita EPG, Gomes-Silva A, Guerra JA de O, et al. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110(6):797–800.
36. Braga RR, Lainson R, Ishikawa EAY, Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) utingensis* n.sp., a parasite from the sandfly *Lutzomyia (Viannamyia) tuberculata* in Amazonian Brazil. *Parasite*. 2003;10:111-8.
37. Cantanhêde LM, Mattos CB, Ronconi CS, Filgueira CPB, Júnior CFS, Limeira C, et al. First report of *Leishmania (Viannia) lindenbergi* causing tegumentary leishmaniasis in the Brazilian western Amazon region. *Parasite*. 2019;26:30.
38. Silveira FT, Ishikawa EAI, De Souza AAA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 2002;9:43-50.

7. DISCUSSÃO

O estudo foi pioneiro em testar uma nova logística de coleta e envio de amostras biológicas em papel filtro de Roraima para o outros centros de estudo do Brasil. Especificamente em nosso estudo, o material foi enviado para o Rio de Janeiro, mantendo os critérios de viabilidade das amostras. O protocolo corroborou as afirmações de Silva et al. (2004), que desenvolveu o seu estudo de padronização de um ensaio de PCR para o diagnóstico de LV utilizando sangue, fragmentos ósseos e amostras de medula em papel de filtro, mantendo a qualidade da amostra e conservando material genético suficiente para conclusão da pesquisa. O estudo traz ainda o pioneirismo de demonstrar a epidemiologia dos casos identificados de LC no Estado com resultados de amostras de todas as regiões do estado, desenvolvido utilizando ferramentas biomoleculares, aonde se demonstra a distribuição de casos de LC e ainda se estabelece as espécies circulantes do parasito em humanos.

A frequência dos pacientes de acordo com o local de origem, demonstrou que quase em sua totalidade os casos eram de pacientes do Brasil residentes nos diversos municípios de Roraima. No entanto, tivemos casos de pacientes da Guiana e Venezuela, países fronteiriços com Roraima. Os casos da Venezuela e da Guiana podem estar ligados à atividade intensa de garimpo nestes país e muitos destes pacientes vem em busca de diagnóstico e tratamento juntamente com os brasileiros que lá exercem a atividade de garimpagem.

O estudo revela ainda um percentual de 7,9% (n= 6) em pacientes indígenas, corroborando com os resultados de um estudo de Pezente (2019) que descreve o perfil epidemiológico da LC no Estado de Roraima entre os anos 2007 e 2016, aonde consta uma incidência de 13% em populações indígenas, demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para entendimento da endemia nesta população específica do Estado.

No presente estudo, a maioria dos pacientes com suspeitas clínicas de LC são de pessoas que vivem no meio rural, sugerindo que a transmissão esteja

relacionada às atividades de garimpo, pesca, caça, extração de madeira dentre outras atividades do meio rural, apesar de sete pacientes, relataram no momento da notificação serem de Boa Vista capital.

A taxa de positividade para o parasito foi maior no gênero masculino e a faixa etária variou entre 7 meses e 62 anos, com uma média de 33,5 anos. Ressalta-se que a faixa etária entre 21 a 40 anos com 60,53% (n= 46) teve a maior incidência dos casos, uma faixa etária importante, pois concentra a maior parte da população produtiva economicamente. Este perfil foi semelhante aos observados por Pezent (2019) quando avaliou os aspectos epidemiológicos da leishmaniose no estado e outros estudos em estados da amazônia como observado nos trabalhos de Correa (2007) (32,6 anos), Coelho et al., (2011) (31,6 anos).

Este estudo realizado no estado de Roraima, revelou a predominância de 80,3% (n= 61) de lesões únicas em pacientes na pele típicas da LC. Os resultados coadunam com os dados apresentados por Alves (2011) em seu estudo de padronização de um método Imuno-Histoquímico para confirmação da leishmaniose tegumentar, e com outros estudos como o de Naiff et al (2009) no Amazonas, Bacha (2009) no Pará e Coelho et al. (2011) no Amazonas, que também demonstraram resultados similares aos observados no presente estudo.

Relativamente à distribuição por municípios do número de casos em que os isolados foram submetidos ao sequenciamento, tivemos casos distribuídos em 9 dos 15 municípios do estado de Roraima, no município de Presidente Figueredo no Amazonas, Venezuela e Guiana.

Analisando os dados encontrados de acordo com a divisão em microrregiões do IBGE em 2017, verificamos que em os casos estão distribuídos em municípios de todas as microrregiões do estado, se concentrando principalmente em municípios da microrregião Boa Vista (composta pelos municípios de Amajari, Alto Alegre, Boa Vista e Pacaraima) ao norte do Estado, que correspondem à 55,3% (n= 42) dos casos de LC em nosso estudo, fato que pode ter explicação devido estes municípios possuírem áreas de garimpos ativos e estarem também recebendo em primeira instância o fluxo de imigrantes vindos da Venezuela, frutos da crise econômica ora estabelecida neste país fronteiro

com estes municípios. A microrregião nordeste de Roraima (composta pelos municípios de Bonfim, Cantá, Normandia, Uiramutã) do estado apresentaram 9,2% (n= 3) dos casos de LC. A microrregião Caracarái (composta pelos municípios de Caracarái, Iracema, Mucajaí) apresentou 13,2% (n= 3) dos casos de LC. Os municípios da microrregião sudeste (Caroebe, São Luiz, São João da Baliza, Rorainópolis) do estado apresentaram respectivamente 14,5%(n= 3) dos casos de LC na pesquisa, ficando apenas os municípios de São João da Baliza e Rorainópolis desta região que não apresentaram casos, fato que explicita que a LC esteja sendo diagnosticada e tratada no próprio município, pois no SINAN, estes municípios apresentam casos notificados. Esta casuística do estudo, é semelhante à relatada pela vigilância epidemiológica do estado, que destaca neste grupo de municípios o de Caroebe e Rorainópolis, que possuem histórico contínuo de notificações de LC ao longo dos anos, onde os casos são relacionados com as atividades de extração de madeira e de grandes plantações de bananas.

O estudo revelou ainda que o município de Boa Vista com capital de mesmo nome apresentou 11,8% (n=9) dos casos que, apesar de informarem residência na área urbana, possivelmente pertencem à zona rural do município ou são pacientes que tenham vindo do interior do estado, da Venezuela ou mesmo da Guiana e tenha realizado o diagnóstico no centro de referência do Mecejana e dado o endereço de residência na capital, pois não há relato de casos autóctones de LC na Capital do Estado. Os municípios de São Luiz, Iracema, Presidente Figueiredo (município do Amazonas) e os países da Guiana e Venezuela com um índice do total dos casos pequeno no estudo, não significam que estas localidades não sejam áreas que não mereçam atenção relativa ao controle da endemia no estado, pois o Município de Pacaraima na fronteira com a Venezuela, que não consta no estudo por exemplo, tem um histórico de transmissão de LC ao longo dos anos notificados no SINAN e aparece atualmente agravada com o número de casos exportados da Venezuela.

No estudo, *L. (V) braziliensis* foi identificada em 30,3% (n= 23) das amostras, sendo encontrada em material de lesão em pacientes de seis

municípios. No Brasil, este protozoário está incriminado como o principal agente causador de LT, sendo identificado em diferentes ambientes nas diversas regiões brasileiras e ultimamente, também em expansão na região amazônica, aonde, tem se verificado um predomínio de casos ocasionados pela *L. (V.) braziliensis* e secundariamente por *L. (L.) amazonensis* (Aprigio, 2013). Entretanto, acredita-se que esta espécie esteja circulando e causando a doença em todos os municípios do Estado, visto que o parasito foi identificado em pelo menos um município de cada microrregião e que no estudo, 25% (n= 19) das amostras foram identificadas como *Leishmania sp*, podendo dentre estas, ser *L. braziliensis*. Esta ideia fica ainda mais contundente, quando analisamos o estudo de Gama e colaboradores (2012) sobre a fauna flebotomínica (*Diptera: Psychodidae*) em floresta preservada e alterada do município de Caroebe, localizado ao sul do estado, aonde o autor identificou *Lutzomyia davisii*, como a espécie mais abundante na floresta primária em seu estudo e que esta espécie tem sido encontrada naturalmente infectada com *L. (V.) braziliensis* em várias localidades com ocorrência de LT na Amazônia brasileira (SOUZA, 2010).

Gama et al 2010 pesquisando sobre a Fauna flebotomínica (*Diptera: Psychodidae*) na Serra do Tepequém, Município de Amajari, Estado de Roraima, Brasil, chama a atenção para o encontro de *L. flaviscutellata* em seu estudo, pois se reveste de importância epidemiológica por ser o principal vetor da *L. (L.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972, na Amazônia brasileira.

A *L. (L.) amazonensis* foi a segunda espécie mais identificada em nosso estudo, sendo encontrada nos municípios de Boa Vista, Alto alegre, Cantà, Caroebe, Mucajaí, São Luiz, Amajari e Venezuela. Aprigio (2013) em Rondônia, obteve resultado semelhante a deste estudo. Coelho et al., (2011), em Manaus/AM, verificou que esta espécie foi a terceira mais encontrada. A *L. (L.) amazonensis* tem um papel importante na saúde pública, em vista deste agente causar uma forma rara da doença, Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), que induz anergia na resposta imune celular do indivíduo. Além disso, já foram encontrados casos de indivíduos com a forma mucosa causada por este parasito (BARRAL et al., 1999; BRASIL, 2017; APRIGIO, 2013).

L. umbratilis, vetor principal de *L. (V.) guyanensis*, foi identificada nos estudo de Gama et al (2010) na serra do Tepequem em Amajari e a esta época o autor já referia que a espécie tem ampla distribuição na Região Amazônica, encontrada associada a bases de árvores em áreas de floresta primária e que apesar de pouco frequente, a ocorrência de *L. umbratilis* na Serra do Tepequem deveria ser vista como um sinal de alerta, uma vez que o contato com essa espécie em áreas de floresta geralmente resulta na transmissão de *L. (V.) guyanensis* aos humanos . A presença da *L. (V.) guyanensis* em amostras nos município de Alto Alegre, Caroebe e Guiana em nosso estudo, reforça a preocupação do autor e demonstra que esta espécie pode estar circulando em maior escala ou na mesma proporção, nas demais regiões do estado. Clinicamente, os indivíduos acometidos por esta espécie podem apresentar lesões únicas, ou múltiplas, sendo esta última com mais frequência devido a várias picadas do vetor ou metástases linfáticas, com possibilidade de apresentação de linfagites (Lainson, 2010). Guerra et al., (2011), todavia, identificaram uma espécie em amostras de lesões mucosas de um indivíduo no Estado de Rondônia, ampliando a possibilidade da apresentação clínica por este protozoário.

Pela primeira vez, em Roraima, tem-se registro da *L. panamensis* nos municípios de Boa Vista, Alto Alegre Pacaraima e Amajari, todos municípios localizados na região norte do estado.

L. panamensis é o principal agente causador da leishmaniose tegumentar no Panamá (Vásquez et al, 1998) e na Colômbia (Davies, et al, 2000) e é responsável por um número relativamente grande de casos em outros países vizinhos e no Panamá, existem cerca de 3.000 novos casos por ano.

Também detectamos a presença de *L. (V.) shawi* em dois casos humanos. Essa espécie foi detectada em macacos das espécies *Cebus appela* e *Chiropotes satanus*, preguiças *Choloepus didactylus* e *Bradypus tridactylus*, *procyonid Nasua nasua* e no flebotomíneo *Lutzomyia whitmani*, todos de áreas de floresta primária do Estado do Pará (LAINSON. et al., 1989).

Em uma amostra do estudo foi detectada a presença de *L. (V.) naiffi*, que é um achado pouco comum em casos de LT em humanos no Brasil. Os poucos

relatos foram descritos nos estados do Amazonas (FIGUEIRA et al., 2008), Pará e Rondônia, sendo neste último a identificação da espécie ocorreu no tatú, *Dasytus novemcinctus* (Naiff et al., 1991). O número reduzido de casos detectados deve-se ao fato de que este protozoário possa induzir a uma infecção benigna que cura-se de forma espontânea. Em uma amostra do estudo foi detectada a presença de *L. (V) utingensis*, descrita por Braga et al, (2003) em Belém, Pará. Em uma amostra do estudo foi detectada a presença de *L. lindenbergi*, espécie descoberta em soldados envolvidos em missões realizadas em florestas degradadas na Cidade de Belém, Estado do Pará, Brasil, (Silveira et al, 2002.) Estas duas espécies aparecem esporadicamente em estudo na Amazônia brasileira e sempre na proporção de um a dois casos, como neste estudo e com poucos conhecimentos sobre seus vetores.

Ainda destacamos no estudo um índice de 25% (n= 19) de *Leishmania sp.* que não foi possível definir a espécie, mas que possivelmente, seja em sua grande maioria pertencente às espécies já definidas no estudo.

Do ponto de vista epidemiológico, este estudo é pioneiro em determinar as espécies de *Leishmania* circulantes em Roraima por biologia molecular. Assim, tornam-se necessárias mais investigações, tendo em vista ao tratamento ora vigente no país para LC, os vetores, hospedeiros, a incidência da doença, os agentes etiológicos, bem como as ações de vigilância e controle no estado de Roraima.

8. COCLUSÕES

A Leishmaniose Tegumentar, no estudo, acometeu, predominantemente, homens em idade produtiva, com apresentação de única lesão em sua maioria, que desempenhavam alguma atividade agropecuarista, de garimpagem ou de lazer.

A PCR-RFLP do ITS-1 e kDNA, juntamente com o sequenciamento genômico foram capazes de identificar as espécies *L. (V) braziliensis*, *L. (L) amazonensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamensis*, *L.(V) shawi*, *L.(V) naiffi*, *L.(V) ubingensis*, e *L.(V) lindenbergi*, nos materiais obtidos dos esfregaços impregnados em papel filtro de pacientes com suspeita diagnóstica LT encaminhados das unidades de saúde selecionadas do Estado para o estudo.

Das espécies identificadas a *L. (V.) braziliensis* foi a espécie prevalente no estudo, sendo encontrada em amostras de pacientes em seis municípios do estado;

Destaca-se que das sete espécies incriminadas no Brasil como agente causador da doença, seis foram identificadas, e que a presença da *L. panamensis* foi identificada pela primeira vez circulando entre humanos no estado, e que este fato, desperta a curiosidade e necessidade de mais estudos que possa elucidar a presença da espécie no estado, bem como seus potenciais vetores e hospedeiros.

O estado de Roraima apresenta fatores propícios para a endemicidade da doença, despertando-se assim, a necessidade de maiores estudos sobre medidas de prevenção e controle das leishmanioses em todas suas microrregiões.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHOUNDI M, KUHLIS K, CANNET A, VOTÝPKA J, MARTY P, DELAUNAY P, *et al.* (2016) A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis 10(3): e0004349. doi:10.1371/ journal.pntd.0004349

ALMEIDA, J.V; BRAZIL, R.P, Retrospective Study of Cutaneous Leishmaniasis in The State of Roraima, North of Brazil, Journal of Dermatology and Clinical Research, 2017.

ALVES, C.F. Padronização de um método imuno-histoquímico para confirmação da Leishmaniose tegumentar. Dissertação de mestrado; Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

APRÍGIO, C.J. L. Caracterização das espécies de Leishmania em amostras biológicas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana avaliados em sete unidades de saúde e estudo da fauna flebotomínica em áreas de três municípios do estado de Rondônia. / Cesarino Junior Lima Aprígio. Porto Velho, Rondônia, 2013.

AZEREDO – COUTINHO, R.B; MENDONÇA, S.C.F..Formas Clínicas das leishmanioses tegumentares nas Américas, In: Conceição-Silva F, Alves C.R. Leishmaniose do continente americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014.

BACHA, H.A. Identificação molecular das espécies de leishmânia em lesões cutâneas de pacientes atendidos no Centro de Controle de Zoonoses de Santarém, Pará. 2009. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BARBOSA, M.G; FERREIRA, L.C. Mucosal Leishmaniasis Caused by Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in the Brazilian Amazon. PLOS Neglec trop diseases. 2011; 5 (3): 980.

BARRAL A, PEDRAL-SAMPAIO D, JR. GG, MOEM H, MCMAHON-PRATT D, JESUS AR et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that Leishmania amazonensis produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg. 44, p. 536–546, 1991.

BASANO, S.A. & CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle, Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, Nº 3, 2004.

BASANO, S.A. & CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, Nº 3, 2004.

BATES, P.A & ROGERES, M.E. New Insights in to the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. Current Molecular Medicine, 4(6): 601 – 609, 2004.

BELLI, A, RODRIGUEZ, B, AVILES, H, HARRIS, E.. Simplified polymerase chain reaction detection of new world Leishmania in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1998;58:102-9.

BENSOUSSAN, E; NASEREDDIN, A; JONAS, F; SCHUR, L.F; JAFFE, C.L. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2006; 44:1435-9.

BERRAHAL, F, MARY, C, ROZE, M, BERENGER, A, ESCOFFIER, K, LAMOUREUX, D, DUNAN, S, Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. Am J Trop Med Hyg. 1996; 55:273-7.

BioEstat 5.0. Download de Arquivos. Disponível em: <http://www.mamiraua.org.br/download/index.php?dirpath=./BioEstat%205%20Portugues&order=0>. Accessed in September 2019.

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

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

BRAGA, R.R; LAINSON, R; ISHIKAWA, E.A.Y; SHAW, J.J. *Leishmania utingensis* n.sp., a parasite from the sand fly *Lutzomyia* (*Viannamyia*) *tuberculata* in Amazonian Brazil. *Parasite*. 2003;10:111-8.

BRASIL, M.S. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net 2013.

BRASIL, M.S. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net 2019.

BRASIL, M.S. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL, M.S. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRAZIL, R.P, BRAZIL, B.G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel EF, Lainson R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014. p.257-274

BRAZIL, R.P, BRAZIL, B.G. Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Conceição-Silva F, Alves CR. Leishmaniose do continente americano. Rio de

BRAZIL, R.P, RODRIGUES, A.F; ANDRADE FILHO, J.D. Sand Fly Vectors of Leishmania in the Americas - A Mini Review. Entomol Ornithol Herpetol. 2015; 4:144

CAMARGO, L.M.A, BARCINSKI, M.A Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. Ciência e Cultura 2003, 1:34-7.

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

CARDOSO, M.S; BENTO, G.A, ALMEIDA, L. V; CASTRO, J. C; REIS-CUNHA, J.L; BARBOSA, V.A. (2019). Detection of multiple circulating *Leishmania* species in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Governador Valadares, southeastern Brazil. PLoS ONE 14(2): e 0211831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211831>.

CDC. Leishmaniasis. Centers for Disease Control and Prevention. 2018. [Acesso em 20 outubro de 2018]. Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/>

COELHO, L.I.C; PAES, M; GUERRA, J.A; BARBOSA, M.G; COELHO, C; LIMA, B *et al.* Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil Parasitol Res, 108, p. 671–677, 2011.

CORREA, E.A. Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da Leishmaniose Tegumentar Americana nos subespaços 07 e 08 no estado de Rondônia. 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Brasília, Distrito Federal, 2007.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. Gaz Med Bahia. 2005 jan-jun; 75(1):3-17.

CUPOLILLO, E; BOITÉ, M.C; PORROZZI, R. Considerações sobre a taxonomia do Gênero Leishmania. In: Conceição-Silva F, Alves C.R. Leishmaniose do continente americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014.

CUPOLILLO, E; SCHOENIAN, G; KUHL, K; AUWERA, G.V; MAURICIO, I; CRUZ, I. Manual Molecular Procedures: Training course, molecular epidemiology and leishmaniasis. Leishmaniasis Epidemiology Network South America. Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2009.

DAVIES C.R; REITHINGER, R; CAMPBELL-LENDRUM, D; FELICIANGELI, D; BORGES, R; RODRIGUEZ, N. Epidemiologia e controle da leishmaniose nos países andinos. *Cafajeste. Saude Publica* 16, 925–50 (2000).

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

DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative). Leishmanioses. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>, Acesso em outubro de 2019.

FERREIRA, J. Após imigração, hospital em Pacaraima registrou 64,5 mil atendimentos no ano. *Jornal Roraima em Tempo*. 2018.

FIGUEIRA, L.P; ZANOTTI, M; PINHEIRO, F.G; FRANCO, A.M.R. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(5), p. 512-514, 2008.

FIGUEIRA, L.P; SOARES, F.V, NAIFF, M.F; SIMAS, S.S, ESPIR, T.T, PINHEIRO, F.G *et al.*. Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no

município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. Rev Patol Trop. 2014; 43: 173-181.

PINHEIRO, F.G; FRANCO, A.M. Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. Rev Patol Trop. 2014; 43: 173 -181.

FISA, R; RIERA, C; GÁLLEGO, M; MANUBENS, J; PORTÚS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. Vet Parasitol. 2001;99:105-11.

FLOCH, H. *Leishmania tropica* guyanensis n.ssp., agent de la leishmaniose tégumentaire des Guyanas et de l'Amérique Centrale. Archives de Institut Pasteur de La Guyane Française, Cahors, v. 15, p. 1-4, 1954.

FREITAS, A. Geografia e História de Roraima. 8ª ed. Boa Vista: DLM. 2012.

FREITAS, S.F. Padronização e formulação do custo da PCR-RFLP para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar Americana em papel de filtro [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2007. 112 p.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Textos de Epidemiologia para vigilância ambiental em saúde/coordenação. Brasília, 2002.

GENBANK. International Nucleotide Sequence Database. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Accessed in Juner 2020.

GAMA NETO, J.L, BAIMA, J.M; FREITAS, R.A; PASSOS, M.A.B. Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) da Serra do Tepequém, Município de Amajari, Estado de Roraima, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. 2010;1(2):131-6.

GAMA NETO, J.L.; BAIMA, J.M.; FREITAS, R.A.; PASSOS, M.A.B. Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) em floresta preservada e alterada do Município de Caroebe, Estado de Roraima, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude v.3 n.2 Ananindeua jun. 2012.

GARCIA, A; PARRADO, R; DE DONCKER, S; BERMUDEZ, H; DUJARDIN, J. American tegumentar leishmaniasis: direct species identification of Leishmania in non-invasive clinical samples. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 101: 368-371, 2007.

GARCIA, L; KINDT, A; BERMUDEZ, H; LLANOS-CUENTAS, A; DE DONCKER, S; AREVALO, J; TINTAYA, K.W.Q; DUJARDIN, J.C. Culture-independent species typing of neotropical Leishmania for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. Journal of Clinical Microbiology 42: 2294-2297, 2004.

GARCIA, A.L; PARRADO, R; DE DONCKER, S; BERMUDEZ, H; DUJARDIN, J.C. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of Leishmania in noninvasive clinical samples. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007; 101:368-71.

GONTIJO, B; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36:71-80.

GUERRA J, PRESTES S, SILVEIRA H, COELHO L, GAMA P, MOURA A, AMATO V, REBELLO, J. M. M. ET AL. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de leishmanioses, em área de ecoturismo do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 26, n.1, 2011.

HANS-FILHO, G; NASCIMENTO, R.A.F; NAKAZATO, K.R.O, DORVAL, M.E.M.C. Leishmaniose Tegumentar Americana: estudo clinico, epidemiologico

e laboratorial realizado no Hospital Universitario de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *An Bras Dermatol.* 2011;86(1):55-63.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativa populacional do Estado de Roraima, 2019.

JANSEN, M.A; ROQUE, A.L.R. Hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* spp. e sua importância na manutenção dos ciclos de transmissão nos ambientes silvestres e sinantrópico, In: Conceição-Silva F, Alves C.R. *Leishmaniose do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014.

LACHAUD, L; MARCHERGUI-HAMMAMI, S; CHABBERT, E; DEREURE, J, DEDET, J.P, BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002;40:210-5.

LAINSON, R; SHAW, J.J. Taxonomy of the New World *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972;66(6):943-4.

LAINSON, R; SHAW; J.J. Leishmaniasis y las leishmanias del nuevo mundo, con particular referencia en Brasil. *Bol Ofic San Pan.* 1974;76(2):93-114.

LAINSON R, Shaw JJ. New world Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. *Microbiology and Microbial Infections* (9 a ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.

LAINSON R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina* 1997; 11(1): 29-40.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amaz Saude*, 1(2), p. 13-32, 2010.

LAINSON, R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina* 1997; 11(1): 29-40.

LAINSON, R; BRAGA, R.R, SOUZA, A.A; POVOA, M.M; ISHIKAWA, E.A, SILVEIRA, F.T. *Leishmania (Viannia) shawi* sp.n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1989;64(3):200-7.

LAINSON, R; SHAW J.J. New world Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. *Microbiology and Infections* (9ª. ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.

LAINSON, R; SHAW, J.J. Leishmaniasis in the New World. In L Collier, A Balows, M Sussman (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th ed, Parasitology. v. 5, p. 313-349. 2005.

LIMA, J.R: Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimonial pentavalente. Dissertação (mestrado – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017, 146f.

LLANES, A; RESTREPO, C.M; VECCHIO, G.D; ANGUIZOLA, F.J; LLEONART, R. O genoma de *Leishmania panamensis*: insights sobre a genômica do subgênero *L. (Viannia)*. *Sci Rep* 5, 8550 (2015). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep08550>

LOPEZ, M; INGA, R; CANGALAYA, M; ECHEVARRIA, J; LLANOS-CUENTAS, A; ORREGO, C et al. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 49(3):348–56. PMID: 8396860.

MAPSOFWORD. Roraima estado e mapa do Brasil. Disponível em: <https://pt.mapsofworld.com/brasil/estados/roraima.html>. Acesso em: outubro 2019.

JÚNIOR, R.D.N; PINHEIRO, F.G; NAIFF, M.F; SOUZA, I.L; CASTRO, L.M; MENEZES, M.P, *et al.* Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Rev. Patol. Trop.* 38 (2), p.103-114, 2009.

NAIFF, R.D; FREITAS, R.A; NAIFF, M.F; ARIAS, J.R; BARRETT, T.V; MOME, H, *et al.* Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Laison & Shaw, 1989. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol.86(3):317-321, 1991.

NAIFF-JÚNIOR, R.D; PINHEIRO, F.G; NAIFF, M.F; SOUZA, I.S; CASTRO, L.M; MENEZES, M.P; FRANCO, A.M.R. 2009. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 38: 103-104.

NASCIMENTO, J., & RODRIGUES.M. (28 de Outubro de 2003). Análise da atuação dos Conselhos Municipais de Saúde dos Municípios de Amajari e Pacaraima no período de 2001 a 2003. Boa Vista, Roraima, Brasil: Fiocruz.

NEGRÃO, G.N; FERREIRA, M.E.M. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. *Revista Percurso NEMO*, Maringá, v. 6, n. 1, p. 147- 168, 2014 ISSN: 2177- 3300.

NEVES D.P, MELO, A.L; LINARDI, P.M; VITOR, R.W.A. *Parasitologia Humana*. 11ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. p. 47-64.

Organização Panamericana da Saúde - OPAS/OMS. Informe Leishmanioses das Américas Nº 7 - Março de 2019. Acesso em setembro 2019.

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

PEZENTE LG; BENEDETTI, M.S.G. Perfil epidemiológico da leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Roraima, Amazônia, Brasil, entre 2007 e 2016. Braz. J. Hea. Rev., Curitiba, v. 2, n. 3, p. 1734-1742, mar./apr. 2019.

PIMENTA, P.F; TURCO; S.J; MCCONVILLE, M.J; LAWYER, P.G, PERKINS, P.V; SACKS, D.L. Stage –specific adhesion of Leishmania promastigotes to the Sandyflay midgut. Science, 256 (5.065): 1.812, 1992.

PORTAL PARAMAZÔNIA. Amazonia legal brasileira, internacional e região norte, disp. em: <http://portalparamazonia.blogspot.com/2016/01/amazonia-legal-e-internacional.html>. Acessado em: outubro de 2019.

REBELLO, J. M. M; JÚNIOR, A.N.A; SILVA, A; MORAES, J.G. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de leishmanioses, em área de ecoturismo do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 26, n.1, p. 195-198, 2010.

REITHINGER, R; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J Clin Microbiol. 2007; 45:21-5.

ROSELINO, A.M. Biologia molecular aplicada as dermatoses tropicais Molecular biology in tropical dermatoses. An Bras Dermatol. 2008;83(3):187-203.

ROSSI, A. K; SIBAJEV, A; PALMA, M.L.M; PELLOSO, V.A. Situação epidemiológica da leishmaniose tegumentar americana no Estado de Roraima e HIV associada. Reunião Regional da SBPC em Boa Vista. 2010.

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

SATOW, M.M, YAMASHIRO-KANASHIRO, E.H, ROCHA, M.C, OYAFUSO, L.K, SOLER, R.C, COTRIM, P.C, LINDOSOS, J.A.L. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of american tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Ver Inst Med Trop São Paulo*. 2013;55:393-9.

SCHÖNIAN, G; NASEREDDIN, A; DINSE, N; SCHWEYNOCH, C; SCHALLIG, H.D; PRESBER, W; JAFFE, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microb Infec Disease*. 2003; 47(1):349–358.

SERAFIM TD, COUTINHO-ABREU IV, OLIVEIRA F, MENESES C, KAMHAWI S, VALENZUELA JG. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat Microbiol*. 2018 May;3(5):548-555. doi: 10.1038/s41564-018-0125-7. Epub 2018 Mar 19. PMID: 29556108; PMCID: PMC6007031.

SESAU – RR, Secretaria de Estado da Saúde de Roraima. Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima 2018.

SIEVERS F, WILM A, DINEEN D, GIBSON TJ, KARPLUS K, LI W, et al. Geração rápida e escalonável de alinhamentos de múltiplas sequências de proteínas de alta qualidade usando Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011; 7 (539) 1-6.

SILVA, E.S; GONTIJO, C.M.F; PACHECO, R.S; AND BRAZIL, R.P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research* 3 (2): 251-257, 2004.

SILVA, N.S, MUNIZ, V.D. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Amazônia brasileira. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 25(6):1325-1336, jun, 2009.

SILVEIRA FT, LAINSON R, SHAW JJ, BRAGA RR, ISHIKAWA EAY, SOUZA AAA. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de Leishmania (Viannia) lainsoni do roedor Agouti paca (Rodentia: Dasyproctidae) no Estado do Pará, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. Janeiro-fevereiro de 1991; 33 (1): 18-22.

SILVEIRA, F.T; ISHIKAWA, EAI; DE SOUZA, AAA; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by Leishmania (Viannia) lindenbergi n. sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. Parasite. v. 9, p. 43-50. 2002.

SINGH, S. New developments diagnosis of Leishmaniasis. Indian J Med Res. 2006; 123:311-30.

SOUZA, A.A.A; SILVEIRA, F.T; LAINSON, R; BARATA, I.R; SILVA, M.G.S, LIMA, J.A.N. Fauna flebotômica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. Rev Pan-Amaz Saude. 2010 mar;1(1):45-51.

SOUZA, C.F. Estudo da leishmaniose tegumentar americana na região urbana do município de Timóteo e no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. Tese de doutorado, Rio de Janeiro 2015.

TAI, E.L; OSMAN, N.O., EL FARI, O.F.M., PRESBER, W., SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 94, 575–579.2000.

TOJAL, A.C; CUPOLILLO, E; VOLPINI, A.C; ALMEIDA, R; ROMERO, G.A.S. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, State of Acre, Brazil. Tropical Medicine & International Health. Sep;11(9):1388-98, 2006.

TROMBETTA, C.M. Migração e situações de fronteira. Brasília, Centro Scalabrino de Estudos Migratórios, Editora, 2002.

VÁSQUEZ, A.; PAZ, H.; ALVAR, J.; PÉREZ, D; HERNÁNDEZ, C. Informe Final: Estudos Sobre a Epidemiologia da Leishmaniose na Parte Ocidental da República do Panamá. (Instituto Conmemorativo Gorgas de Estúdio da Saúde; Ministério da Saúde, 1998).

VERGEL, C; PALACIOS, R; CADENA, H. Evidence for Leishmania (Viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment". Journal of Infection Disease. v. 194 (4), p. 503–511. 2006.

VIANNA G. Sobre uma nova especie de Leishmania (Nota Preliminar). Bras Med. 1911; 25: 411.

WHO. Leishmaniasis [cited 3 Set. 2019] [Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>].

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Diagnóstico e Caracterização de *Leishmania* spp. em Amostras Clínicas de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar no Estado de Roraima.

Pesquisador Responsável: Joseneide Viana de Almeida

Orientação do Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brasil

Este projeto tem o objetivo de Caracterizar as espécies de *Leishmania* spp. circulantes entre humanos em amostras isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em áreas endêmicas do Estado de Roraima.

Para tanto, faz-se necessário a análise bioquímica de material biológico da lesão, que já é colhido para o diagnóstico de leishmaniose nas unidades de saúde pela técnica de PCR e Isoenzimas, o qual pedimos vossa autorização para utilização de parte da amostra nesta pesquisa. Estou ciente de que a participação na pesquisa trará riscos mínimos como leve desconforto pela punção e/ou escarificação que cessam logo após o procedimento não havendo necessidade de intervenção médica. Ainda solicitamos a autorização de produção de imagens da(s) lesões por máquina fotográfica a fim de estabelecer correlação clínica das lesões apresentadas com lesões de pacientes já pesquisados em outras regiões. Será assegurado o sigilo dos dados dos pesquisados conforme resolução 466/12.

Estou ciente de que não haverá formas de ressarcimento ou de indenização pela minha participação no desenvolvimento da pesquisa, tendo como benefício indireto a proposição de políticas públicas de saúde pelo estudo aos gestores no controle da endemia no Estado.

Após ler e receber explicações sobre a pesquisa, e ter meus direitos de:

5. receber resposta a qualquer pergunta e esclarecimento sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados à pesquisa;
6. retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;
7. não ser identificado e ser mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à privacidade.
8. procurar esclarecimentos com o pesquisador JOSENEIDE VIANA DE ALMEIDA, por meio do número de telefone (095) 99112-6940 ou Núcleo ObservaRR – UFRR Campus do Paricarana - Universidade Federal de Roraima Tel: (95) 3623 - 4117, em caso de dúvidas ou notificação de acontecimentos não previstos.

Eu, _____,
declaro estar ciente do anteriormente exposto e concordo voluntariamente em participar desta pesquisa, assinando este consentimento em duas vias, ficando com a posse de uma delas.

Boa Vista-RR, ____ de _____ de _____ .

Assinatura do participante da pesquisa:

Eu, *JOSENEIDE VIANA DE ALMEIDA*, declaro que forneci todas as informações referentes à pesquisa ao participante, de forma apropriada e voluntária.

Boa Vista-RR, ____ de _____ de _____ .

Assinatura do pesquisador: _____

Contato do pesquisador: (95 991126940, e-mail: jvaenf@yahoo.com.br)

CARTA DE ANUÊNCIA PARA AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA

Ilmo Sr. Secretário de Estado da Saúde de Roraima Cesar Ferreira Penna Faria

Solicitamos autorização institucional para realização da pesquisa intitulada Diagnóstico e Caracterização de *Leishmania* spp. em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar no Estado de Roraima a ser realizada nas unidades de saúde da Secretaria Estadual de Saúde de Boa Vista (LACEM), Unidade Mista de Caroebe, **HOSPITAL DÉLIO DE OLIVEIRA TUPINAMBÁ** de Pacaraima, **HOSPITAL REGIONAL SUL GOVERNADOR OTTOMAR DE SOUZA PINTO** de Rorainópolis e **HOSPITAL PEDRO ALVARES RODRIGUES** de Bonfim , pelo aluno *de pós-graduação Joseneide Viana de Almeida*, sob orientação do **Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brasil**, com o(s) seguinte(s) objetivo(s): Caracterizar os casos suspeitos de LTA sob o ponto de vista clínico e proceder ao diagnóstico através da biopsia da(s) lesão (ões); Isolar *Leishmania* spp. de amostras de pacientes suspeitas de LTA; Identificar e caracterizar as espécies de *Leishmania* em pacientes com diagnóstico parasitológico de LTA nos municípios de Caroebe, Rorainópolis, Pacaraima, Bonfim e Boa Vista no Estado de Roraima por PCR de material de biopsia e por análise de isoenzimas dos isolados; Verificar a correlação entre as espécies identificadas e os locais de infecção na procedência dos pacientes; Identificar o tipo de alta do paciente: se por cura ou por abandono de tratamento na perspectiva de averiguar possíveis casos de resistência ao tratamento, necessitando portanto, ter acesso aos dados a serem colhidos no setor de *laboratório de coleta de amostras de diagnóstico das unidades referidas*, da estrutura da Sesau - RR. Ao mesmo tempo, pedimos autorização para que o nome desta instituição possa constar no relatório final bem como em futuras publicações na forma de artigo científico e de tese de doutorado.

Ressaltamos que os dados coletados serão mantidos em absoluto sigilo de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS/MS) 466/12 que trata da Pesquisa envolvendo Seres Humanos. Salientamos ainda que tais dados serão utilizados somente para realização deste estudo.

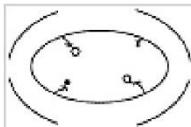
Na certeza de contarmos com a colaboração e empenho desta Secretaria, agradecemos antecipadamente a atenção, ficando à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessário.

Boa Vista, _____ de _____ de _____.

Prof. Mestre Joseneide Viana de Almeida
Pesquisador Responsável do Projeto

Concordamos com a solicitação Não concordamos com a solicitação

Cesar Ferreira Penna Faria
Secretário de Estado da Saúde de Roraima



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DE LEISHMANIA SPP. EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO ESTADO DE RORAIMA

Pesquisador: Joseneide Viana de Almeida

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57445116.3.0000.5302

Instituição Proponente: Universidade Federal de Roraima - UFR

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Roraima - UFR

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.625.157

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de tese de doutorado (DINTER FIOCRUZ/UFRR) sobre a caracterização de espécies de Leishmania spp. isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana do Estado de Roraima devido ao aumento do número de casos, nos últimos anos, em Roraima, com frequência maior em áreas de assentamentos populacionais. Serão incluídos no estudo os pacientes que forem atendidos no LACEN (Laboratório Central de Roraima) e unidades de saúde dos municípios Rorainópolis, Caroebe (sul do estado), Pacaraima (na fronteira com a Venezuela) e Bonfim (na fronteira com a Guiana) com hipótese diagnóstica de LTA.

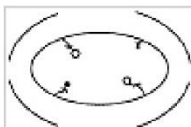
Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar as espécies de Leishmania spp. circulantes entre humanos em amostras isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em áreas endêmicas do Estado de Roraima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com a pesquisadora, os riscos são mínimos, como leve desconforto pela punção e/ou escarificação que cessam logo após o procedimento não havendo necessidade de intervenção médica. Em relação aos benefícios, a pesquisadora informou, no TCLE, que o benefício

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.304-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br



Continuação do Parecer: 1.625.157

indireto seria a proposição de políticas públicas no controle da endemia no Estado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa mostra-se relevante, pois os seus resultados podem ser utilizados para a elaboração de medidas preventivas nos municípios de maior incidência do agravo (Leishmaniose Tegumentar) no Estado de Roraima.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa apresenta os requisitos para aprovação por este comitê.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|----------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_721214.pdf | 14/06/2016 20:38:44 | | Aceito |
| Outros | Contcarta.pdf | 14/06/2016 20:36:33 | Joseneide Viana de Almeida | Aceito |
| Outros | Carta.pdf | 14/06/2016 20:34:44 | Joseneide Viana de Almeida | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.doc | 14/06/2016 20:32:24 | Joseneide Viana de Almeida | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO.docx | 14/06/2016 20:30:01 | Joseneide Viana de Almeida | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhaRosto.pdf | 14/06/2016 20:23:23 | Joseneide Viana de Almeida | Aceito |

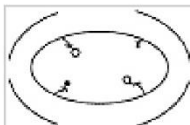
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.304-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 1.625.157

BOA VISTA, 06 de Julho de 2016

Assinado por:
Ijanílio Gabriel de Araújo
(Coordenador)

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.304-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br

Página 03 de 03
