



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS  
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARIZA DE MATOS SALGUEIRO

**RESIDÊNCIA E DESLOCAMENTOS POR IMIGRAÇÕES, ATIVIDADES  
LABORAIS OU LAZER NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM CENTRO DE  
REFERÊNCIA DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ NO RIO DE JANEIRO, 2000-  
2015**

Rio de Janeiro

2020

TESE DE DOUTORADO PCDI-INI M.M.SALGUEIRO 2020

MARIZA DE MATOS SALGUEIRO

**RESIDÊNCIA E DESLOCAMENTOS POR IMIGRAÇÕES, ATIVIDADES  
LABORAIS OU LAZER NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM CENTRO DE  
REFERÊNCIA DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ NO RIO DE JANEIRO, 2000-  
2015**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel

Coorientador: Prof. Dr. Sandro Javier Bedoya Pacheco

Rio de Janeiro

2020

MARIZA DE MATOS SALGUEIRO

**RESIDÊNCIA E DESLOCAMENTOS POR IMIGRAÇÕES, ATIVIDADES LABORAIS OU LAZER NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM CENTRO DE REFERÊNCIA DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ NO RIO DE JANEIRO, 2000-2015**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

Orientadora: Profa. Dra Maria Inês Fernandes Pimentel

Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Javier Bedoya Pacheco

**BANCA EXAMINADORA**

Aprovado em:

**Membros Titulares:**

---

Prof. Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi  
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas  
Presidente

---

Profa. Dra. Maria Helena de Araújo Melo  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Membro

---

Prof. Dr. Marcelo Rosandiski Lyra  
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI/Fiocruz  
Membro

---

Profa. Dra. Liliane de Fátima Antonio Oliveira  
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI/Fiocruz  
Membro e revisora

---

Profa. Dra. Luciana de Freitas Campos Miranda  
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI/Fiocruz  
Membro

---

Profa. Dra. Aline Fagundes da Silva  
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI/Fiocruz  
Suplente

A meu filho Pedro

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho.

Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.  
Al andar se hace el camino,  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.  
Caminante no hay camino  
sino estelas en la mar.  
(Antonio Machado)

Salgueiro, M.M. **Residência e deslocamentos por imigrações, atividades laborais ou lazer na leishmaniose cutânea em Centro de Referência da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, 2000-2015**. Rio de Janeiro, 2020, 112 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz.

### **Resumo:**

A leishmaniose cutânea (LC) do ponto de vista da Medicina do Trabalhador ou da Saúde do Viajante tem chamado atenção crescente, sendo uma das condições de risco para pessoas que trabalham ou se deslocam para áreas endêmicas. As informações relacionadas aos deslocamentos por imigrações, atividade laborais e de lazer na LC no Brasil são escassas. Objetivou-se estudar os casos de LC segundo residência ou deslocamentos por imigrações, trabalho ou lazer. Estudo retrospectivo com uma coorte de 711 pacientes com LC atendidos entre 2000 e 2015 no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Os 696 pacientes com domicílio no estado do Rio de Janeiro (RJ) foram estudados quanto à transmissão por motivo de residência ou deslocamentos por imigração, trabalho ou lazer. Os 171 pacientes com história de deslocamentos foram incluídos em uma análise espacial com o uso de ferramentas de geoprocessamento. De 465 pacientes com visualização ou isolamento parasitário, as espécies de *Leishmania* puderam ser identificadas em 66,8%. Houve marcado predomínio do sexo masculino nos moradores do RJ (63%). A média de idade foi de 35,9 anos (desvio-padrão 19,2). O local provável de infecção predominante foi a residência em área endêmica (82,6%), com diversidade de profissões. Quanto à transmissão por deslocamentos relacionados a atividades laborais (7,5%), os militares representaram a parcela mais importante. Percentuais menores se deveram a deslocamento por imigração (3,6%) ou lazer (6,3%). A espécie predominante foi *Leishmania (Viannia) braziliensis*, sendo responsável pela quase totalidade dos isolados tipados quando o motivo de transmissão foi residência em área endêmica. A maior variedade de espécies e variantes foi encontrada quando a transmissão ocorreu por deslocamentos devido a atividades laborais. A endemia nos casos autóctones do estado do RJ predominou em áreas urbanas; houve maior ocorrência nas cidades em torno da área florestada da região serrana. No município do Rio de Janeiro, casos autóctones ocorreram principalmente nos bairros que circundam os maciços da Pedra Branca e Gericinó-Mendanha, áreas florestadas no interior da região urbana. Quanto aos isolados de 171 pacientes com história de deslocamento, estes foram identificados como *L. (V.) braziliensis* em 104 casos (80,8%) além de *L. (V.) naiffi* (7,7%), *L. (V.) guyanensis* (6,7%), *L. (Leishmania) amazonensis* (1%), e variantes genéticas de *L. (V.) braziliensis* (3,8%). Os mapas de fluxo mostraram que o local provável de infecção incluiu quatro países, 19 estados brasileiros e 18 cidades do estado do RJ. Os locais prováveis de infecção em estados diferentes do RJ foram no Amazonas (32), Bahia (18) e Ceará (15 pacientes). O conhecimento do fluxo migratório e da localização geográfica dessas espécies de *Leishmania* trazidas de outros locais pode contribuir para a vigilância da LC no estado do RJ, já que existe a possibilidade de que estas espécies possam ser introduzidas em áreas suscetíveis com flebotômíneos e se estabelecer em território fluminense, com repercussões nas apresentações clínicas, no tratamento e no controle da doença. Nossos resultados demonstram a complexidade geográfica e epidemiológica da leishmaniose cutânea no RJ.

**PALAVRAS CHAVES:** Leishmaniose cutânea; medicina de viagem; doença relacionada a viagens; doenças ocupacionais; epidemiologia.

Salgueiro, M.M. **Residence and displacements by immigration, labor and leisure activities in cutaneous leishmaniosis in a reference center at Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro, 2000-2015.** Rio de Janeiro, 2020, 112 f. Thesis [Doctorate in Clinical Research in Infectious Diseases] - Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases - Oswaldo Cruz Foundation.

**Abstract:**

Cutaneous leishmaniasis (CL) from the point of view of occupational medicine or traveller's health has drawn increasing attention, being one of the risk conditions for people who work or move to endemic areas. Information related to displacement due to immigration, work and leisure activities in CL in Brazil is scarce. The objective was to study the cases of CL according to the residence or displacements due to immigration, work or leisure. Retrospective study with a cohort of 711 patients with CL attended between 2000 and 2015 at Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. The 696 patients domiciled in the state of Rio de Janeiro (RJ) were studied for transmission due to residence or displacement due to immigration, work or leisure. The 171 patients with a history of displacement were included in a spatial analysis using geoprocessing tools. *Leishmania* species could be identified in 66.8% of 465 patients with parasitic visualization or isolation. There was a marked predominance of males in residents of RJ (63%). The mean age was 35.9 years (SD 19.2). The most likely infection site was the residence in endemic area (82.6%), with diversity of professions. Regarding transmission by displacements related to work activities (7.5%), military personnel represented the most important group. Lower percentages were due to immigration (3.6%) or leisure (6.3%) displacements. The predominant species was *Leishmania (Viannia) braziliensis*, being responsible for almost all of the characterized isolates when the reason for transmission was residence in endemic areas. The greatest variety of species and variants was found when transmission occurred due to displacement for labor activities. The endemic in the autochthonous cases of the state of RJ predominated in urban areas; there was a higher occurrence in the cities around the forested area of the mountain region. In the municipality of Rio de Janeiro, autochthonous cases occurred mainly in the neighborhoods surrounding the Pedra Branca and Gericinó-Mendanha massifs, forested areas in the interior of the urban region. Regarding the isolates of 171 patients with a history of displacement, these were identified as *L. (V.) braziliensis* in 104 cases (80.8%) in addition to *L. (V.) naiffi* (7.7%), *L. (V.) guyanensis* (6.7%), *L. (Leishmania) amazonensis* (1%), and genetic variants of *L. (V.) braziliensis* (3.8%). The flow maps showed that the probable site of infection included four countries, 19 Brazilian states and 18 cities in the state of RJ. The probable sites of infection in Brazilian states other than RJ were in Amazonas (32), Bahia (18) and Ceará (15 patients). The knowledge of the migratory flow and the geographic location of these *Leishmania* species brought from other areas can contribute to the surveillance of CL in the state of RJ, since there is a possibility that these species can be introduced in areas with susceptible sand flies and establish themselves in the territory, with repercussions on clinical presentations, treatment and disease control. Our results demonstrate the geographical and epidemiological complexity of cutaneous leishmaniasis in RJ.

**KEY WORDS:** Cutaneous leishmaniasis; travel medicine; disease related to travelling; occupational diseases; epidemiology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proporção de casos de leishmaniose cutânea e mucosa por grupo de idade e país, Américas, 2018.....	19
Figura 2: Proporção de casos de leishmaniose cutânea e mucosa em menores de 10 anos, Américas, 2018.....	20
Figura 3. <i>Status</i> de endemidade da leishmaniose cutânea ao redor do mundo, 2016. ....	26
Figura 4: Teoria da expansão amazônica da leishmaniose tegumentar por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> a partir das migrações humanas segundo Marzochi & Marzochi, 1994, citado por Bedoya-Pacheco et al, 2011.....	27
Figura 5: Lesão de leishmaniose cutânea com confirmação histopatológica, localizada na perna, em paciente residente no Brasil que adquiriu a doença durante estadia em Israel.....	29

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 1

Figura 1: Distribuição dos casos de leishmaniose cutânea nos municípios do estado do Rio de Janeiro segundo transmissão em área urbana, periurbana (intermediária) e rural, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 a 2015.....	56
Figura 2: Distribuição dos casos de leishmaniose cutânea nos municípios do estado do Rio de Janeiro segundo quadriênio de ocorrência. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 a 2015.....	57
Figura 3: Distribuição dos casos de leishmaniose cutânea no estado do Rio de Janeiro (A) e no município do Rio de Janeiro (B). Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 a 2015.....	58

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 2

Figura 1: Análise filogenética demonstrando espécies de <i>Leshmania (Viannia)</i> com sequenciamento de ITS1-rDNA.....	67
---	----

Figura 2: Espécies de <i>Leishmania</i> no estado do Rio de Janeiro (RJ).....	<b>68</b>
Figura 3: Espécies de <i>Leishmania</i> na cidade do Rio de Janeiro .....	<b>69</b>
Figura 4: Gráfico de pizza das espécies de <i>Leishmania</i> , representando a distribuição agregada das espécies de <i>Leishmania</i> por cidades do estado do Rio de Janeiro.....	<b>70</b>
Figura 5: Mapa de fluxo com densidade de casos no estado do Rio de Janeiro....	<b>71</b>
Figura 6: Mapa de fluxo para o Rio de Janeiro com densidade de casos de outros países e de estados brasileiros.....	<b>72</b>

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1: Distribuição dos pacientes segundo possível local de transmissão de leishmaniose cutânea, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 a 2015.....	54
Tabela 2: Distribuição das espécies parasitárias nos pacientes estudados segundo o possível local de transmissão de leishmaniose cutânea, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, 2000 a 2015.....	55

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1: Características sociodemográficas e clínicas de 162 pacientes diagnosticados com leishmaniose tegumentar americana no INI/Fiocruz de 2000 a 2015.....	65
Tabela 2: Identificação de 104 espécies de <i>Leishmania</i> quanto à razão para exposição.....	66
Tabela 3: Técnicas de identificação usadas para tipagem de 104 espécies de <i>Leishmania</i> isoladas de viajantes e migrantes que foram atendidos no INI/Fiocruz de 2000 a 2015.....	66
Tabela 4: Porcentagem de distância genética entre isolados P4 e outras espécies de <i>Leishmania</i> em sequências por ITS-rDNA obtidas do GenBank.....	67
Tabela 5: Espécies de <i>Leishmania</i> identificadas de acordo com o local provável de infecção em regiões brasileiras ou outros países.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Bst</i> UI	Enzima de restrição <i>Bst</i> UI
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Hae</i> III	Enzima de restrição <i>Hae</i> III
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
<i>hsp</i> 70C	gene da proteína do choque térmico 70
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Reação de imunofluorescência indireta
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
ITS-rDNA	Transcritor do espaço interno do DNA ribossomal
kg	Kilograma
LaPClin Vigileish	Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>
<i>L. (Viannia) naiffi</i>	<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>
<i>L. (Viannia) shawi</i>	<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>
<i>L. (Viannia) lindenbergi</i>	<i>Leishmania (Viannia) lindenbergi</i>
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>
<i>L. (V.) naiffi</i>	<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>
<i>Leishmania</i> spp	Espécies de <i>Leishmania</i>
mg	Miligramas
OPAS	Organização Panamericana da Saúde
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PCR-RFLP	Reação da polimerase em cadeia com polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

RJ

SES

Sb<sup>5+</sup>

WHO

Estado do Rio de Janeiro

Secretaria de Estado de Saúde

Íon antimônio

*World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>17</b>
1.1	Leishmaniose tegumentar americana.....	17
1.2	Formas clínicas de leishmaniose cutânea (LC).....	18
1.3	Diagnóstico da LTA.....	20
1.4	Tratamento da LTA.....	21
1.5	Epidemiologia da LTA.....	22
1.6	Leishmaniose cutânea relacionada a atividades laborais.....	24
1.7	Leishmaniose cutânea como doença do viajante.....	28
<b>2</b>	<b>Justificativa.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>36</b>
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
<b>4</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>37</b>
4.1	Primeiro artigo.....	38
4.2	Segundo artigo.....	59
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>87</b>
	<b>Anexo I: Parecer consolidado do CEP/INI.....</b>	<b>109</b>
	<b>Anexo II: Termo de compromisso e responsabilidade.....</b>	<b>112</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são reconhecidas como doenças que podem acometer pessoas que fizeram deslocamentos territoriais em virtude de viagens turísticas, migratórias ou a trabalho, em passado recente ou muitos meses ou anos anteriormente ao desenvolvimento da enfermidade. Configuram preocupação nos países não endêmicos, devido principalmente à falta de familiaridade dos médicos com estas doenças, gerando dificuldades no diagnóstico diferencial e no manejo terapêutico dos pacientes acometidos (BART et al., 2013; KUNA et al., 2019; SAVOIA, 2015; VINETZ; SOONG, 2007).

Nas Américas, as leishmanioses são classificadas como visceral e tegumentar. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) compreende as formas clínicas leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa ou mucocutânea. Os agentes da LTA diferem daqueles encontrados no Velho Mundo. A imensa maioria dos casos de LTA se manifesta com lesões exclusivamente cutâneas; entretanto, a possibilidade, embora pequena, de desenvolvimento de lesões mucosas leva a preocupação relevante, devido ao maior potencial de destruição tecidual e de piora na qualidade de vida (BRASIL, 2017; EIRAS et al., 2015). Os quadros clínicos variam em função da espécie infectante e do status imunológico do paciente. Dados clínicos e dados epidemiológicos como aqueles oriundos da história de viagens do paciente orientam o tipo de tratamento a ser ministrado (MORIZOT et al., 2013); além disso, a maior possibilidade de identificação do agente infectante através de técnicas diagnósticas variadas (BART et al., 2013; DI MUCCIO et al., 2015, EIRAS et al., 2015) pode levar a decisões terapêuticas orientadas pela espécie, com potencial de substancial maior eficácia dos tratamentos em relação à cura e aos efeitos adversos dos medicamentos disponíveis (EIRAS et al., 2015; MORIZOT et al., 2013).

### 1.1 Leishmaniose tegumentar americana

A LTA é uma importante doença endêmica no Brasil. Entre 1985 e 2005, o número de casos anuais foi de cerca de 28.500, com coeficiente de detecção médio de 18,5 casos / 100.000 habitantes, afetando todas as unidades da federação (BRASIL, 2010). Nos últimos anos, o número de casos no Brasil diminuiu consideravelmente; entre 2009 e 2018, o número médio de casos anuais de LTA foi de 19.331 (BRASIL, 2020a) e o coeficiente de detecção médio foi de 9,72 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2020b). Ainda assim, a transmissão de leishmaniose cutânea e mucosa pelo índice composto da Organização

Panamericana da Saúde no triênio 2016-2018 foi considerada muito intensa, com 49,8% da população brasileira em áreas de transmissão (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2019).

O homem é um hospedeiro acidental que adquire a doença pela picada da fêmea infectada do inseto vetor. O quadro clínico da LTA depende das espécies infectantes e também da resposta imune do hospedeiro, principalmente a resposta imune mediada por células (BRASIL, 2017). Conforme a espécie de *Leishmania* envolvida e a resposta imunológica do paciente, a infecção pode ser subclínica (FAGUNDES, 2007) ou evoluir para a forma cutânea ou cutaneomucosa (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Sete espécies de *Leishmania* causadoras de LTA foram identificadas no Brasil, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, sendo as principais: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. Essas três espécies têm uma distribuição mais ampla, amazônica e extra-amazônica, principalmente a primeira. *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) shawi* (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003) e *L. (Viannia) lindenbergi* foram identificadas predominantemente na região Norte (BRASIL, 2017; SILVEIRA et al., 2002). A LTA causada pelas diferentes espécies tem particularidades geográficas e clínicas, embora com predomínio da forma típica de LC.

No Rio de Janeiro (RJ), a LTA é causada quase totalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e o principal vetor é *Lutzomyia intermedia*, mas outros vetores, como *Lu. migonei*, podem estar implicados na transmissão dos parasitos. Estes vetores se adaptaram ao ambiente domiciliar e peridomiciliar, especialmente nas áreas periurbanas e rurais (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). A população de *L. (V.) braziliensis* circulante neste estado parece ser geneticamente bastante homogênea (BAPTISTA et al., 2009). Um único caso de leishmaniose difusa por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi descrito no RJ em 2007 (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007). Mais recentemente, um caso de leishmaniose cutânea típica sem acometimento visceral causada por *Leishmania infantum* em área urbana do município do Rio de Janeiro também foi descrito (LYRA et al., 2015).

## **1.2 Formas clínicas de leishmaniose cutânea (LC)**

A LC pode ser classificada em formas: a) cutânea localizada (típica), com lesão única ou múltiplas; b) cutânea disseminada, com dez ou mais lesões polimórficas (ulceradas, papulosas ou de aparência acneiforme), acometendo vários segmentos corporais; c) *recidiva cutis*, como reativação na borda de cicatriz prévia; e d) a rara forma difusa, com lesões infiltradas podendo atingir grandes extensões (BRASIL, 2017; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

A maioria dos pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* apresenta a forma cutânea típica (BARRAL et al., 1995). A úlcera típica de LC é indolor e costuma localizar-se em áreas da pele expostas à picada de insetos. São habitualmente arredondadas ou ovaladas, com base eritematosa, de consistência firme, e bordas infiltradas elevadas e bem delimitadas; o fundo é geralmente eritematoso com granulações grosseiras (PESSÔA; BARRETO, 1948). Infecção bacteriana ou fúngica secundária pode estar associada a dor local e exsudato purulento que pode dessecar-se em crostas; estas podem recobrir o fundo da úlcera (ANTONIO et al., 2017; PESSÔA; BARRETO, 1948).

Lesões muito numerosas são incomuns. Na leishmaniose disseminada ocorre disseminação hemática com 10 ou mais lesões cutâneas afetando partes não contíguas do corpo, pleomórficas, podendo chegar a centenas; em até 44% dos casos, coexistem lesões mucosas (BRASIL, 2017; ROSA; MACHADO, 2011).

A LC é uma das condições em que pode ocorrer lesão cutânea acompanhada de linfangite e gomas ao longo do trajeto linfático; neste caso, é conhecida como leishmaniose esporotricóide, devido à sua semelhança com a forma típica de esporotricose (CARVALHO et al., 2017). Na Amazônia, com muitas espécies prevalentes de *Leishmania*, esta apresentação clínica não é infrequente (SILVEIRA et al., 2004).

Após o tratamento, as lesões cutâneas costumam deixar cicatrizes atróficas, deprimidas, com superfície lisa e áreas de hipo ou de hiperpigmentação. Algumas vezes tornam-se hipertróficas (traves fibrosas). Podem ainda se tornar imperceptíveis, na dependência da localização e tamanho da lesão original; neste caso, adquirem a cor da pele circunjacente. Cura espontânea pode ocorrer mesmo sem tratamento específico (MARSDEN et al., 1984; OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2017). As lesões podem, entretanto, permanecer ativas por muitos anos, podendo surgir lesões concomitantes em membranas mucosas (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; PESSÔA; BARRETO, 1948).

A leishmaniose mucosa (LM) no Brasil está associada ao acometimento por *L. (V.) braziliensis* e geralmente afeta o revestimento mucoso das vias aerodigestivas superiores. É considerada uma forma clínica mais grave, por levar a maior destruição tecidual que pode gerar sequelas importantes (BRASIL, 2017). Sua ocorrência no Brasil é influenciada pelos níveis de endemicidade, sendo mais frequente em áreas onde a infecção é mais recente (BEDOYA-PACHECO et al., 2011). A LM apresenta as seguintes formas clínicas: mucosa tardia, que é a mais comum, surgindo após a cura da LC e associada a lesões múltiplas ou de longa duração, cura espontânea ou tratamento insuficiente; mucosa de origem indeterminada, que se apresenta clinicamente isolada e sem evidência de LC anterior, possivelmente associada a infecções subclínicas ou lesões pequenas não ulceradas e de evolução rápida que teriam passado despercebidas sem deixar cicatrizes perceptíveis; mucosa concomitante, quando a lesão mucosa ocorre distante da lesão cutânea, mas há

coexistência de ambas; mucosa contígua, quando ocorre por propagação direta de lesão cutânea, localizada próxima a orifícios naturais, para a mucosa das vias aerodigestivas superiores; mucosa primária, ocorrendo eventualmente pela picada do vetor na mucosa ou semimucosa de lábios e genitais (BRASIL, 2017; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

### **1.3 Diagnóstico da LTA**

O diagnóstico é realizado pela história epidemiológica e pelo exame clínico, com auxílio de exames complementares. Na prática, o teste complementar mais utilizado, associado à resposta imune celular, era a intradermorreação de Montenegro (IDRM), com cerca de 90% de sensibilidade (FAGUNDES, 2007). Entretanto, há alguns anos este teste não está mais disponível no Brasil. A intradermorreação de Montenegro tem algumas limitações, dentre as quais não permitir a diferenciação entre doença pregressa e atual, poder ser afetada por hipersensibilidade ao conservante da fórmula, ser negativa nas primeiras semanas de doença, ser afetada por estados avançados de imunodeficiências (FAGUNDES, 2007).

Os métodos sorológicos não são mais considerados como testes diagnósticos (BRASIL, 2017), mas são úteis para casos em que a manifestação clínica é compatível com LTA e outros testes foram negativos. Dentre os métodos sorológicos estão a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), úteis também para o acompanhamento dos casos (FURTADO, 1980).

O diagnóstico de certeza se obtém pela demonstração do parasito, por meio da pesquisa direta das formas amastigotas (escarificação ou aspiração de lesão, ou aposição em lâmina - "imprint" - de fragmento de lesão cutânea ou de lesão mucosa obtido por procedimento de biópsia) ou cultura (aspirado ou fragmento de lesão cutânea ou de lesão mucosa). A pesquisa direta, embora tenha menor sensibilidade que a cultura, é de fácil realização e tem menor custo (MELLO et al., 2011). O isolamento do parasito em fragmento de lesão semeado em meios de cultura apropriados permite a visualização de promastigotas com boa sensibilidade (FURTADO, 1980; ROMERO et al., 2001). O diagnóstico também pode ser obtido pela pesquisa de parasitos em cortes histológicos (histopatologia convencional e/ou imunohistoquímica) e pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em fragmento de lesão (FAGUNDES et al., 2010). Os índices de sensibilidade da visualização das formas amastigotas nos exames histológicos apresentam ampla variação na literatura (AMATO et al., 2003; FURTADO, 1980). A imunohistoquímica demonstra maior sensibilidade que a coloração por hematoxilina-eosina para a detecção do parasito (QUINTELLA et al., 2009). Quanto à PCR, Pirmez e colaboradores (1999) encontraram 94% de positividade em pacientes com LTA em material de lesão coletado por procedimento de

biópsia, o que conferiu à PCR positividade superior aos demais métodos pesquisados (histopatologia, “imprint” e cultura). Fagundes e colaboradores (2010) encontraram uma sensibilidade de 92,3% e uma especificidade de 93,3% para a PCR, recomendando seu uso em especial nos casos em que os métodos convencionais forem negativos.

#### 1.4 Tratamento da LTA

Os antimoniais pentavalentes constituem os fármacos de primeira linha para o tratamento da LTA (WHO, 2010), e no Brasil a formulação disponível é o antimoniato de meglumina (BRASIL, 2017).

O sucesso dos antimoniais varia largamente (ROMERO et al., 2001), com vários relatos de falha do tratamento com estas medicações (LAWN, 2003). Alguns fatores foram associados com falha terapêutica, entre os quais múltiplas (mais de 3) lesões cutâneas, tratamento prévio para leishmaniose, alto peso corporal e esquema de tratamento incompleto (RODRIGUES et al., 2006), uso de subdoses e tratamento irregular (SOTO; SOTO, 2006), resposta à IDR e tempo de evolução das lesões (ANTONIO et al., 2014).

A dose do íon antimônio recomendada para tratamento de LC no Brasil é de 10 a 20 mg Sb<sup>5+</sup>/kg/dia durante 20 dias, e para LM é de 20 mg Sb<sup>5+</sup>/kg/dia durante 30 dias (BRASIL, 2017). Entretanto, o uso de uma dose menor (5 mg Sb<sup>5+</sup>/kg/dia) durante 30 dias para tratamento de LC no RJ, e o uso do antimoniato de meglumina por via intralesional para casos especiais passaram a constar nas recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Estes últimos esquemas de tratamento são mais seguros, causando menor número de eventos adversos graves quando comparados às doses convencionais de antimoniato de meglumina (SAHEKI et al., 2017; VASCONCELLOS et al., 2012).

Os medicamentos de segunda escolha são anfotericina B desoxicolato e pentamidina. Nas áreas onde há predomínio de *L. (V.) guyanensis*, a indicação de primeira escolha é a pentamidina, e o antimoniato de meglumina passa a ser de segunda escolha, junto com a anfotericina B desoxicolato. Em qualquer caso, a anfotericina B lipossomal é considerada de primeira escolha para o tratamento de LTA em pacientes com idade a partir de 50 anos; com insuficiência renal, cardíaca ou hepática de qualquer idade; transplantados renais, cardíacos ou hepáticos; e gestantes de qualquer idade (BRASIL, 2017).

A pentamidina é o medicamento de primeira escolha para os casos de leishmaniose cutânea difusa, entretanto é recomendado o acompanhamento em centro de referência (BRASIL, 2017).

Para a leishmaniose mucosa, os protocolos de tratamento consideram como primeira escolha o antimoniato de meglumina associado ou não à pentoxifilina; e a anfotericina B lipossomal para os mesmos casos acima definidos. Como segunda escolha, a anfotericina B desoxicolato ou a pentamidina (BRASIL, 2017).

No caso de coinfeção com HIV, recomenda-se a anfotericina B, e, como segunda escolha, o antimoniato de meglumina e a pentamidina (BRASIL, 2017).

A sensibilidade das diferentes espécies de *Leishmania* aos medicamentos disponíveis varia (ROMERO et al., 2001), havendo casos de resistência do parasito aos antimoniais pentavalentes (LAWN et al., 2003; PIMENTEL et al., 2011).

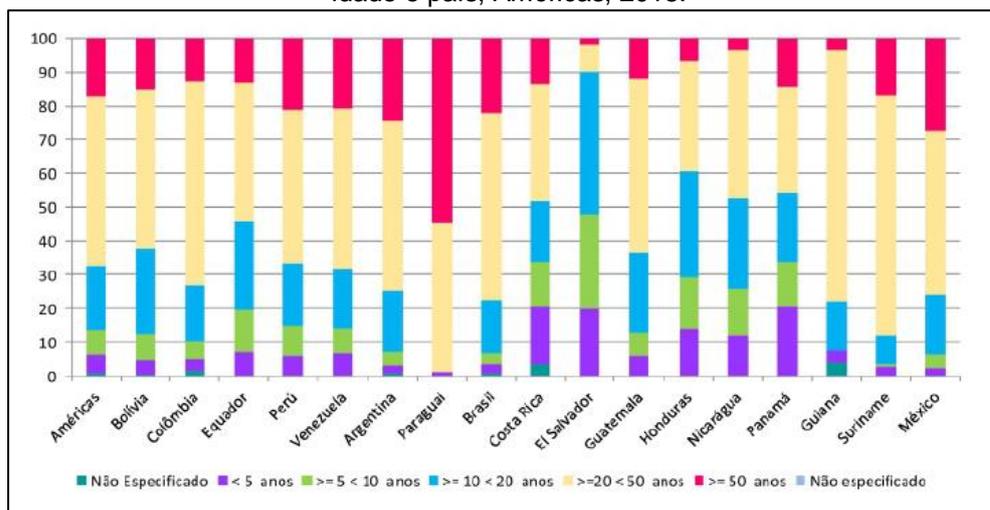
## 1.5 Epidemiologia da LTA

A LTA apresenta diferentes características epidemiológicas conforme a área geográfica afetada. Na maioria das regiões onde ela está presente, ela depende da adaptação dos vetores a áreas habitadas por seres humanos ou da penetração de seres humanos em habitats dos vetores. Deste modo, pode haver exposição aos vetores no domicílio/peridomicílio, e neste caso se esperaria uma distribuição mais equitativa entre os sexos e nas diferentes faixas etárias (BUSTAMANTE et al., 2009; MARZOCHI, 1992; MONTEIRO et al., 2009; VELEZ et al., 2001). A Organização Pan-Americana de Saúde monitora o adoecimento por LTA em menores de 10 anos de idade como um indicativo de infecção no domicílio/peridomicílio (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2019).

Por outro lado, a exposição pode ser decorrente de atividades profissionais que demandem a penetração em habitats naturais dos vetores, resultando geralmente em marcadas diferenças entre os sexos e faixas etárias, que geralmente implicam em maior adoecimento no sexo masculino (ABDELLATIF; EL-MABROUK; EWIS, 2013; ARAUJO et al., 2016; DEDET; PRADINAUD; GAY, 1989; EID et al., 2018; TELES et al., 2015; WEIGEL et al., 1994) e na faixa etária desde adultos jovens (RAWLINGS et al., 2001) até aqueles com idade mais avançada (DETONI et al., 2019), com menor acometimento de crianças; estas podem estar expostas em condições em que haja trabalho infantil, como por exemplo auxílio aos adultos nas atividades agropecuárias (ABDELLATIF; EL-MABROUK; EWIS, 2013).

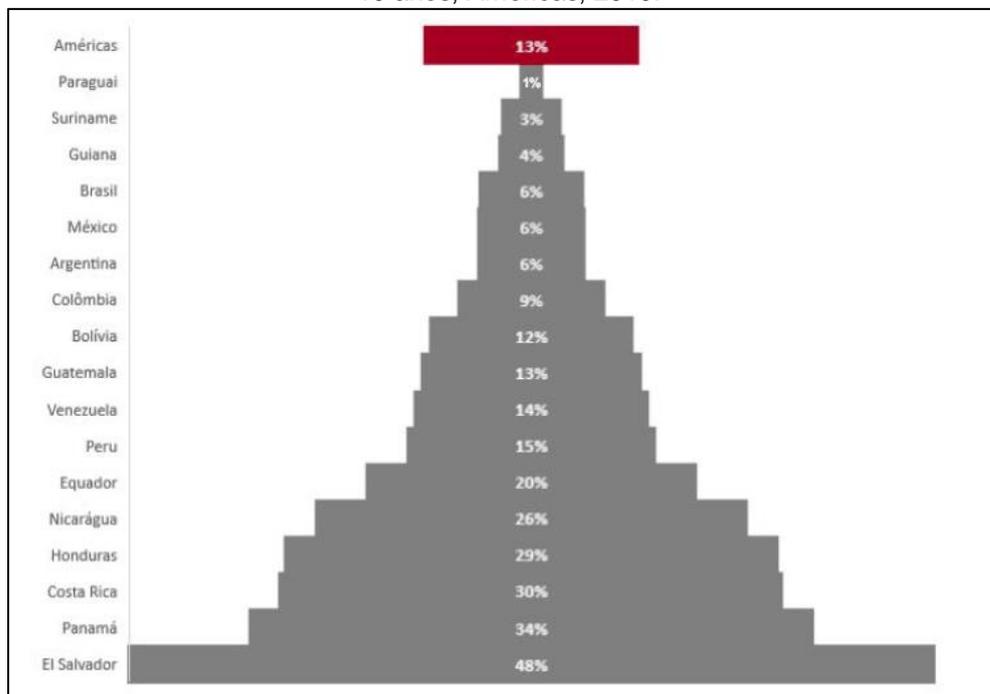
Segundo a Organização Panamericana da Saúde, o Brasil apresenta um perfil de LTA segundo idade que não sugere uma transmissão domiciliar/peridomiciliar, com pouco acometimento de menores de 10 anos (Figuras 1 e 2).

Figura 1: Proporção de casos de leishmaniose cutânea e mucosa por grupo de idade e país, Américas, 2018.



Fonte: Organização Panamericana da Saúde. Leishmanioses. Informe epidemiológico das Américas. Dezembro, 2019.

Figura 2: Proporção de casos de leishmaniose cutânea e mucosa em menores de 10 anos, Américas, 2019.



Fonte: Organização Panamericana da Saúde. Leishmanioses. Informe epidemiológico das Américas. Dezembro, 2019.

## 1.6 Leishmaniose cutânea relacionada a atividades laborais

O adoecimento por leishmaniose cutânea em decorrência de atividades profissionais tem recebido relativamente pouca atenção na literatura. Existem variadas situações em que pessoas são deslocadas para áreas endêmicas devido a situações de trabalho. Isso tem sido mais reconhecido com relação aos militares designados para atuar em regiões conflagradas ou levados para treinamentos em regiões de selva em várias partes do mundo, e que são desta maneira expostos à infecção e ao adoecimento por leishmaniose cutânea (ANDRADE et al., 2005a; ARONSON et al., 1998; BAILEY, 2011; BAILEY, 2012; BAILEY, 2014; BART et al., 2013; GUERRA et al., 2003; MATHESON; WILLIAMS; PLOURDE et al., 2012; PREEDY; ORÉ et al., 2015; VAN THIEL et al., 2010a; VAN THIEL et al., 2011; WORTMANN et al., 2002). Nestes casos, o predomínio masculino é absoluto (GLENNIE; BAILEY, 2010), e a faixa etária mais atingida é a dos adultos jovens (BERGER et al., 2006). Em situações de conflito armado, não apenas militares, mas também refugiados estão sujeitos à infecção, tornando-se necessário proteger populações previamente não expostas em deslocamento para áreas endêmicas (JACOBSON, 2011). Tropas oriundas de diferentes países em áreas sob ocupação militar internacional podem estar expostas a taxas diferentes de adoecimento (KORZENIEWSKI; OLSZAŃSKI 2004).

Uma situação particular é vivida pelos contingentes militares na Colômbia, em que as ações de combate às drogas e situações de conflito armado obrigam à penetração em áreas endêmicas, com subsequente acometimento relevante de militares (PATINO et al., 2017).

Algumas vezes a ocorrência de leishmaniose cutânea pode atingir taxas tão elevadas como 25% dos militares que fazem treinamento na selva em área endêmica (ORÉ et al., 2015; VAN THIEL et al., 2011). A ocorrência da doença pode variar entre áreas diferentes utilizadas nos treinamentos militares, mesmo que no mesmo país e na mesma época (SANCHEZ et al., 1992), ou em área geográfica semelhante em épocas diferentes (ELSTON; MILLER, 2004). A variação ano a ano da incidência pode ser atribuída a variações climáticas (LIGHTBURN et al., 2002) ou a outros fatores. O adoecimento entre os participantes dos exercícios militares pode, entretanto, ser minimizado ou evitado pela disponibilidade e adesão a medidas preventivas, como educação antes da distribuição das tropas, ênfase dos comandantes para a prevenção (VICKERY et al., 2008), uso de mangas longas (ORÉ et al., 2015), repelentes de insetos (BANZET, 2000; DANTAS-TORRES et al., 2017; HYAMS et al., 2001; VICKERY et al., 2008), uniformes e camas tratados com inseticidas (DANTAS-TORRES et al., 2017; VICKERY et al., 2008), aspersão diária de inseticidas nas instalações ocupadas pelos militares (VAN THIEL et al., 2010a; VAN THIEL et al., 2011), e mesmo o uso de velas no lugar de lâmpadas elétricas (BANZET, 2000). A observância estrita das medidas de proteção é importante para a minimização do risco de

infecção em tropas em áreas endêmicas (LIGHTBURN et al., 2002). Entretanto, a própria natureza dos treinamentos militares na selva muitas vezes dificulta o emprego adequado das medidas de proteção, como o uso de mangas longas e camas tratadas com inseticidas (VANBRABANT; VAN DEN BROUCKE; SOENTJENS, 2015). A natureza complexa das atividades militares pode levar à exposição a vetores infectados mesmo com o uso de medidas de proteção contra picadas de insetos (PATINO et al., 2017).

As espécies de vetores predominantes em determinada área com concentração de pessoal militar podem favorecer a transmissão de algumas espécies de *Leishmania*, com implicações diferentes para o tratamento e para as medidas de controle (ANDRADE et al., 2005b; DANTAS-TORRES et al., 2017; GOMES et al., 2013).

Como em outras situações em que a leishmaniose cutânea ocorre em pessoas que estiveram em áreas endêmicas para leishmaniose cutânea e retornaram a seus países de residência, com os militares pode ocorrer retardo no diagnóstico ou diagnósticos equivocados devido à falta de familiaridade dos médicos em seus países com a doença, o que pode levar a condutas terapêuticas equivocadas (BAILEY; LANGMAN, 2014).

O tratamento dos militares com leishmaniose cutânea pode ser realizado em campo (VAN THIEL et al., 2010), ou quando os militares retornam a seus países de origem (ARONSON et al., 1998; WORTMANN et al., 2002). A leishmaniose cutânea pode ser responsável por mais de um quarto dos atendimentos em pessoal militar referido para centros militares especializados em seus países de origem, podendo implicar em custo considerável (GLENNIE; BAILEY, 2010). O tratamento ideal deveria ser orientado pela espécie infectante, entretanto a identificação de espécie requer exames que raramente estão disponíveis nas operações de campo (PREEDY; BAILEY, 2014). A escolha do tratamento depende também da disponibilidade dos fármacos, da experiência dos profissionais médicos, do número e tamanho das lesões e da resposta a tratamentos anteriores (PIMENTEL et al., 2011; VAN DER SNOEK et al. 2017; VAN THIEL et al., 2010b), bem como da origem geográfica da infecção (WILLARD et al. 2005). O não tratamento pode ser uma opção na leishmaniose cutânea, dependendo da espécie infectante, por exemplo, quando causada por *Leishmania major* adquirida no Velho Mundo (WEINA et al., 2004) ou por *Leishmania naiffi* adquirida no Novo Mundo (VAN DER SNOEK, 2009). Militares infectados em locais onde a leishmaniose mucosa é rara podem ser preferentemente tratados com terapias locais, e não sistêmicas (BAILEY, 2011).

Uma preocupação adicional é a introdução dos parasitas nos países onde os militares residem, após sua volta das atividades profissionais em áreas endêmicas para leishmaniose cutânea; neste caso, haveria dependência das condições climáticas e da vegetação locais que favorecessem multiplicação de flebotomíneos, além de outros fatores (CLABORN et al., 2008).

Algumas categorias profissionais podem se expor à infecção por *Leishmania* spp. devido às características laborais, como trabalhadores em áreas rurais (DOURADO et al., 1998, SILVA et al., 1999; GONZÁLEZ M et al., 2000) e na região de transição na interface entre zona urbana e rural (ARAUJO et al., 2016; KAWA; SABROZA, 2002), trabalhadores em ecoturismo e turismo de aventura, biólogos, pesquisadores em trabalhos de campo, geólogos e garimpeiros, e mesmo policiais com trabalho noturno (ABDELLATIF; ELMABROUK; EWIS, 2013; BRITO et al., 2012; DOURADO et al., 1998; SOARES; ABAD-FRANCH; FERRAZ, 2014). Uma outra situação afeta uma categoria profissional particular, os motoristas, que podem eventualmente se expor à infecção como decorrência de suas atividades no comércio entre países ou no deslocamento por motivos laborais entre diferentes áreas endêmicas e não endêmicas (ÇULHA et al., 2018).

O desflorestamento associado a atividades profissionais como mineração, extração de madeira, expansão da fronteira agrícola e criação de gado (HERNÁNDEZ et al., 2019; RAWLINS et al., 2001; ROTUREAU et al., 2006; SALOMÓN et al., 2009; TEDESQUI et al., 2012;) pode resultar em maior incidência de leishmaniose cutânea em determinadas localidades. Em relação a este aspecto, esperam-se mudanças relacionadas ao desflorestamento e às novas práticas no uso do solo (pecuária, agricultura, mineração, represas hidroelétricas, construção de estradas) mesmo em áreas de endemia antiga, como a Amazônia (CONFALONIERI; MARGONARI; QUINTÃO, 2014).

Na Colômbia, 76% dos casos de LTA entre 2010 e 2016 ocorreram em áreas rurais (HERNÁNDEZ et al., 2019). Na área colombiana da Costa do Pacífico, houve associação com ocupação agropecuária, caçadas e extração de madeira (WEIGLE et al., 1993), e no nordeste do país a LTA se associou com áreas de florestas, zonas agrícolas heterogêneas e culturas permanentes (GUTIERREZ et al., 2017). Atividades rurais, como manejo de gado, dormir no local de trabalho e empreender caçadas se associaram com adoecimento por leishmaniose cutânea em locais tão diferentes quanto a Argentina (SOSA-ESTANI et al., 2001), a Tunísia (BELLALI et al., 2017), e a Sicília, Itália (PAU et al., 2009). O estabelecimento de propriedades rurais em áreas antes ocupadas por florestas associou-se a aumento da incidência de leishmaniose cutânea na Argentina, próximo à tríplice fronteira com Brasil e Paraguai (SALOMÓN et al., 2009). A LTA no Noroeste da Argentina está principalmente associada a áreas rurais ou atividades rurais (LOCATELLI et al., 2014). Trabalhadores rurais envolvidos em atividades de irrigação estão mais expostos ao adoecimento por leishmaniose cutânea (BELLALI et al., 2017). Em Alagoas, Brasil, a ocorrência de LTA foi predominante em trabalhadores rurais (PEDROSA; XIMENES, 2009) o que se verificou em Timbaúba, Pernambuco, Brasil (ARAUJO et al., 2016), e também no norte do Paraná entre 2010 e 2015 (DETONI et al., 2019). Por outro lado, foram encontrados vetores (flebotomíneos de diferentes espécies) em plantações de café

(ALEXANDER et al., 2002) e outras áreas de exploração agrícola (MIRANDA et al., 2015), o que pode indicar maior risco de transmissão para os trabalhadores rurais, dependendo do tipo de cultivo. As espécies de flebotomíneos podem também variar de acordo com a monocultura agrícola, como cana-de açúcar ou café (MORENO et al, 2019). A quantidade de flebotomíneos encontrada nestas áreas pode sofrer variação dependendo das condições climáticas como temperatura, umidade e regime pluvial (MIRANDA et al, 2015). A atividade e padrão de ocupação humana na modificação do ambiente, como o manejo de vegetação em assentamentos rurais, podem afetar a dinâmica populacional e distribuição de flebotomíneos, afetando portanto a transmissão local de leishmaniose cutânea (RAMOS et al., 2014). O encontro de flebotomíneos em áreas cultivadas pode constituir um indicativo para que os agricultores afastem as culturas de qualquer residência próxima (MORENO et al. 2020).

No Brasil, classicamente, o adoecimento por LTA se associou a áreas de desflorestamento para construção de rodovias e ferrovias, mas também para o estabelecimento de novas aglomerações humanas e no desenvolvimento de atividades agrícolas. Atualmente, embora ainda mantenha um caráter rural (TEMPONI et al., 2018), a LTA se manifesta também no meio urbano (DETONI et al., 2019), principalmente próximo a remanescentes das áreas florestais e em torno de matas ciliares (NEGRÃO; FERREIRA, 2009).

Segundo o tipo de uso da terra, em Minas Gerais a ocorrência de LTA relacionou-se fortemente com lavoura temporária, pastagem natural, floresta natural, terras inaproveitáveis e população rural, e fracamente com pastagem plantada (TEMPONI et al., 2018). No Vale do Ribeira, estado do Paraná, o adoecimento por LTA predominou largamente na área rural, afetando principalmente trabalhadores rurais, e quando ocorreu na área urbana esteve associado a atividades com penetração da floresta, como caça e pesca (CASTRO et al., 2005). Neste estado, pessoas residentes em área urbana adquiriram a doença em área rural, o que sugere que migração pendular desempenha um papel relevante (MELO: ROSSONI; TEODORO, 2017). Por outro lado, em Campinas, estado de São Paulo, notou-se uma mudança do padrão de acometimento rural para um padrão urbano, e neste caso grande parte dos afetados eram estudantes, empregadas domésticas e donas de casa (CORTE et al., 1996), o que também foi encontrado no estado de Alagoas entre 2000 e 2008 (NUNES; ARAÚJO; CALHEIROS, 2010).

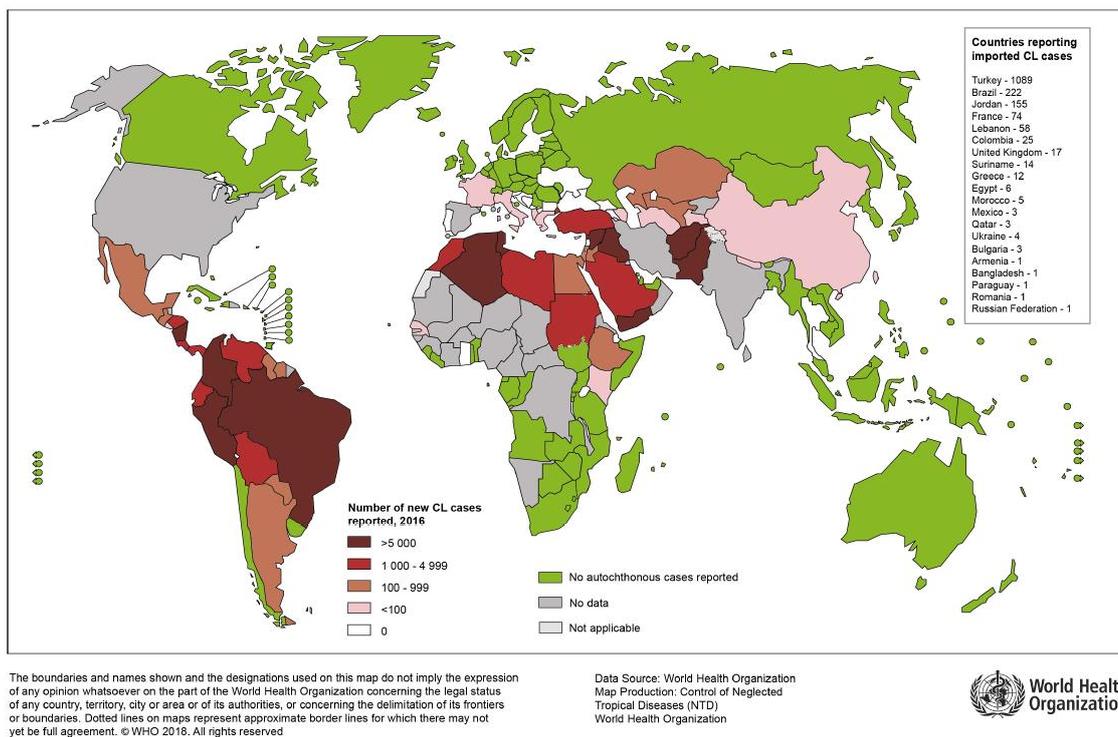
Acidentes de laboratório na manipulação de espécimes também podem raramente resultar em desenvolvimento de lesões de leishmaniose (BRITO et al., 2012; DILLON et al., 1993; HERWALDT, 2001; KNOBLOCH; DEMAR, 1997), demandando que trabalhadores em laboratório sigam estritas normas de biossegurança para evitar este tipo de ocorrência (HERWALDT; JURANEK, 1993).

## 1.7 A leishmaniose cutânea como doença do viajante

A facilidade atual para os deslocamentos humanos vem propiciando o aumento do desenvolvimento de casos de leishmaniose tegumentar fora do local onde a infecção foi adquirida. A migração populacional (BARRY et al., 2014; ROBERTS et al., 2015) e viagens turísticas (HAIDER et al., 2003; ROBERTS et al., 2015; SARANTOPOULOS et al., 2003; STEWARDSON et al., 2010) ou a trabalho (COSTA Jr; MILNER Jr; MAGUIRE, 2003; VANBRABANT; VAN DEN BROUCKE; SOENTJENS, 2015); favorecem o desenvolvimento de casos não autóctones, em períodos variáveis de tempo após o episódio infectante (ACHTMAN et al., 2016; DOWNING; WOC-COLBURN; TYRING, 2014; POEPPL et al., 2011), até vários anos após o evento que levou à infecção (CROWE et al., 2014; STIENLAUF et al., 2005). A associação com picadas de insetos durante a estadia em área endêmica e o agrupamento de casos são fatores adicionais a se valorizar na história clínica (ACHTMAN et al., 2016).

Tráfico humano também está implicado na ocorrência de leishmaniose em países não endêmicos (CANELLA et al., 2011). Migrantes retornando aos seus países de origem, mesmo que para visitar as localidades, amigos e parentes também têm sido mais diagnosticados com leishmaniose (BART et al., 2013; BASHER et al., 2017; HILL, 2006; MORIZOT et al., 2013; ZANGER et al., 2011), bem como residentes de país não endêmico que viajam para visitar parentes e amigos (DI MUCCIO et al., 2015). Viagens para atividades voluntárias, como, por exemplo, trabalho missionário em áreas endêmicas, também pode resultar em adoecimento por leishmaniose cutânea (SOTIROPOULOS; WILBUR, 2001). Atividades em florestas, como ecoturismo, turismo de aventura ou observação de pássaros (PAVLI; MALTEZOU, 2010; RAGHUNATH et al., 2014) podem ser fator de risco para adoecimento. As viagens para turismo de aventura em áreas de florestas na América do Sul têm se destacado como risco para leishmaniose cutânea em residentes de áreas não endêmicas em países desenvolvidos (MANSUETO et al., 2014). Viagens para estudo em áreas endêmicas constituem outra situação em que as pessoas são expostas ao risco de adquirir leishmaniose cutânea (KUILDER et al., 2016). Na Figura 3, observamos o status de endemicidade dos países em 2016, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2019).

Figura 3. Status de endemicidade da leishmaniose cutânea ao redor do mundo, 2016.  
Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2016



Fonte: Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2019).

As migrações humanas podem se refletir em expansão dos limites geográficos das áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar. Marzochi & Marzochi (1994) observaram a importância das ondas migratórias no Brasil entre Amazônia e as regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país nos séculos XIX e XX, coincidindo com períodos de maior acometimento por leishmaniose tegumentar em áreas fora da Amazônia e sugerindo que os humanos e animais domésticos ou sinantrópicos desempenham um papel no estabelecimento de novos focos. A similaridade genética da *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Amazônia e na Região Sul do Brasil (ISHIKAWA et al., 2002), e a maior variabilidade desta espécie na Amazônia e menor variabilidade no restante do país (CUPOLILLO et al., 2003; GOMES et al., 1995) reforçaram o conceito de dispersão clonal da espécie e de origem da leishmaniose tegumentar a partir da Amazônia sugeridos por Marzochi & Marzochi (1994), enfatizando o papel dos deslocamentos humanos na disseminação da endemia, mais do que dos reservatórios animais ou dos insetos vetores (BEDOYA-PACHECO et al. 2011) (Figura 4). A expansão dos limites geográficos da endemia no Texas, a partir da região endêmica ao Sul e Centro para a região Norte do estado, área antes indene para casos autóctones de leishmaniose tegumentar, foi também documentada (WRIGHT et al, 2008).

Figura 4: Teoria da expansão amazônica da leishmaniose tegumentar por *Leishmania (Viannia) braziliensis* a partir das migrações humanas segundo Marzochi & Marzochi, 1994, citado por Bedoya-Pacheco et al, 2011.



A leishmaniose cutânea “importada” acarreta custos para os países não endêmicos, relacionados à investigação e tratamento dos casos, inclusive hospitalização (STIENLAUF et al., 2005).

A leishmaniose cutânea ou mucosa pode ocorrer entre viajantes ou migrantes de uma área endêmica para outra área endêmica distinta (DELGADO et al., 2008); neste caso, o diagnóstico pode ser facilitado pela familiaridade com a doença na área de destino. Entretanto, em países não endêmicos, estes casos constituem um desafio e podem gerar atrasos quanto ao diagnóstico e tratamento, devido à falta de conhecimento técnico dos médicos quanto à doença (BILGIC-TEMEL; MURRELL; UZUN, 2019; CARGNELUTTI et al., 2016; KUNA et al., 2019; POEPPL et al., 2013; SAVOIA, 2015; ZAGHI et al., 2011). O retardo resultante no diagnóstico, mesmo quando as lesões cutâneas são típicas (KUNA et al., 2019), pode agravar o quadro, com cicatrizes desfigurantes em áreas expostas (BILGIC-

TEMEL; MURRELL; UZUN, 2019). Acresce-se a isso a possibilidade de problemas quanto à disponibilidade dos medicamentos recomendados para o tratamento em alguns países e à falta de experiência dos médicos com os tratamentos (BART et al., 2013; SAVOIA, 2015; VINETZ; SOONG, 2007). Adicionalmente, a falta de familiaridade dos médicos com a doença em países não endêmicos dá ensejo ao uso de múltiplos medicamentos para tratamento equivocado das úlceras leishmanióticas como se fossem doenças cutâneas bacterianas, reações não específicas a picadas de inseto, micoses, e até tumores (KELLY, BAUDRY; PEYRON, 2012; SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006). Isso conduz ao uso errôneo de variados antibióticos, antifúngicos e corticosteroides, ou mesmo procedimentos cirúrgicos desnecessários, até que a suspeita seja levantada, seja iniciada a pesquisa etiológica correta e a confirmação seja obtida (BERENS-RIHA et al., 2009; DOWNING; WOC-COLBURN; TYRING, 2014; ERGEN; KING; TULI, 2015; LAURENT et al., 2017; SCHLEUCHER et al., 2008), com repercussões negativas para a saúde do indivíduo, além de despesas desnecessárias.

De modo geral, residentes em países não endêmicos, com lesões que não cicatrizam e que retornaram de áreas endêmicas, a hipótese de leishmaniose cutânea deve ser levantada e investigada (BILGIC-TEMEL; MURRELL; UZUN, 2019; EIRAS; KIRKMAN; MURRAY, 2015; MANFREDI et al, 2001;), mesmo com viagens de curta duração (EHEHALT et al., 2014). A dificuldade pode ser ainda maior quando são lesões mucosas em pacientes em países não endêmicos (LAWN et al, 2004), para as quais o diagnóstico pode demorar muitos anos ou até décadas até ser cogitado e investigado, ou confirmado, com agravamento e cronificação do quadro (GALIOTO; FORNARO, 2002; SCOPE et al., 2003; SCHLEUCHER et al., 2008). No caso de infecção por espécies de *Leishmania* com tropismo para membranas mucosas, como a *Leishmania braziliensis*, a falta de tratamento sistêmico prévio pode influenciar o desenvolvimento de lesões mucosas em pacientes que retornam a países não endêmicos para tais espécies (SOLOMON et al., 2019). Além disso, apresentações clínicas não usuais (WILLEMS et al., 1997) ou localizações pouco comuns (VINETZ; SOONG, 2007) também podem gerar dificuldades para o diagnóstico.

Informações sobre a leishmaniose tegumentar, métodos diagnósticos e manejo da doença para médicos de áreas não endêmicas são importantes para evitar situações de retardo diagnóstico (CARGNELUTTI et al, 2016). Neste aspecto, sobressai o papel de instituições terciárias e de referência em áreas não endêmicas (KUNA et al, 2019).

Figura 5: Lesão de leishmaniose cutânea com confirmação histopatológica, localizada na perna, em paciente residente no Brasil que adquiriu a doença durante estadia em Israel.



Fonte: LaPClin Vigileish.

O tratamento da leishmaniose cutânea ou mucosa pode ser dirigido pela área geográfica de origem da infecção (WISE et al., 2012) ou, quando possível, pela identificação etiológica do agente (ARONSON et al., 2010; BART et al., 2013; COHEN et al., 2015; HODIAMONT et al., 2014; KOFF; ROSEN, 1994; LAVERGNE et al., 2014; MOURI et al., 2014; PÉREZ-AYALA et al., 2009; SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006; WHO, 2010;). A disponibilidade de métodos para o diagnóstico de espécie pode, entretanto, constituir um problema em certos locais, e o início da terapia pode ser baseada em características epidemiológicas e clínicas e a espécie ser presumida (MORIZOT et al., 2013). Métodos tradicionais podem ser efetivos para confirmação de leishmaniose cutânea (FATHI; FATHI, 2013), embora existam métodos mais modernos que propiciam a identificação de espécie, particularmente a reação em cadeia da polimerase (CHAPPUIS, 2011; MOSIMANN et al., 2013; MONTALVO et al., 2015; MOURI et al., 2014; ONDRISKA et al., 2015; SCARISBRICK et al., 2006), embora possam não estar disponíveis em alguns locais. Adicionalmente, em países não endêmicos devem ser levados em conta a experiência do médico e das equipes de saúde, a disponibilidade das medicações, o seu custo, a necessidade ou não de internação hospitalar, as recomendações dos centros de referência e até mesmo a anuência das instituições onde o médico atua (ABADIR; PATEL; HAIDER, 2010; DARLING; REICHENBERG; GAVINO, 2013; ZAGHI et al., 2011). Diante da toxicidade das medicações de uso sistêmico, tratamentos locais como a paromomicina tópica, uso de medicamentos

intralesionais associados ou não à crioterapia, ou dispositivos de calor local podem ser uma boa opção, com efetividade razoável (ARONSON et al., 2010; MORIZOT et al., 2013), principalmente no caso de leishmaniose cutânea do Velho Mundo, que apresenta geralmente tendência à resolução espontânea (KOFF; ROSEN, 1994). A identificação de *Leishmania (Viannia) braziliensis* é geralmente aceita como indicação do uso de terapia sistêmica, devido ao risco de acometimento de mucosas (HARMS et al, 2011). Já a pentamidina é primeira escolha quando o acometimento é na Guiana Francesa, onde a *Leishmania (Viannia) guyanensis* é prevalente (CHRISTEN et al., 2018). Por outro lado, em certas circunstâncias os profissionais de saúde podem optar pela internação hospitalar para o manejo dos casos, devido à toxicidade dos fármacos (SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006; STIENLAUF et al., 2005). As recomendações de tratamento da leishmaniose cutânea têm sofrido modificações ao longo do tempo, devido a novos fármacos e dispositivos, e evidências de que tratamentos locais podem ser adequados mesmo quando antes se recomendaria terapia sistêmica, e isso inclui a leishmaniose tegumentar em países não endêmicos (SHOWLER; BOGGILD, 2015).

O número crescente de casos de leishmaniose em viajantes ocasionou a formação de grupos especificamente voltados para o estudo desta população e para o desenvolvimento de recomendações padronizadas para o manejo destes casos (BLUM et al., 2014; EHEHALT et al., 2014; GUERY et al., 2017). De modo geral, recomenda-se que a espécie seja identificada, e que o tratamento deva ser dirigido à espécie infectante (BLUM et al., 2014).

O aconselhamento antes das viagens é importante para prevenir a ocorrência de doenças endêmicas próprias dos lugares visitados, inclusive leishmaniose cutânea, (FUERTES et al., 2010; HERBINGER et al., 2011; SAVOIA, 2015), mesmo que em viagens dentro do próprio continente (FIELD et al., 2010; HERREMANS et al., 2010), particularmente quanto ao uso de repelentes para evitar doenças transmitidas por insetos (CAUMES et al, 1995). O aconselhamento pós-viagem também pode ser uma ferramenta útil para a vigilância (SOLOMON et al, 2011). Autoridades de áreas turísticas que sejam endêmicas ou em que se constate a presença de flebotomíneos infectados devem realizar aconselhamento aos visitantes e desenvolver programas de manejo ambiental para minimizar o risco (BRILHANTE et al, 2015).

Viagens prolongadas a áreas endêmicas são consideradas de maior risco que viagens curtas para doenças transmitidas por vetores, o que inclui as leishmanioses, entre outros motivos porque, com o tempo, os indivíduos se descuidam das medidas protetoras (CHEN et al., 2009).

Como nos países não endêmicos a notificação de leishmaniose cutânea não é compulsória, a vigilância da doença pode ficar prejudicada; neste particular, casuísticas de

centros de referência para a doença podem refletir com certo grau de razoabilidade a ocorrência de casos (BART et al., 2013; KUNA et al., 2019).

Uma preocupação adicional da leishmaniose “importada” é a possível adaptação de espécies de leishmânias exóticas em áreas que podem ser receptivas devido à existência de flebotomíneos (DI MUCCIO et al, 2015).

Neste estudo pretendemos procurar associar os casos de LTA com atividades laborais dos pacientes afetados e com o deslocamento como risco de transmissão, de um ponto de vista de Medicina do Viajante e Saúde do Trabalhador.

## 2 JUSTIFICATIVA:

A análise da LTA como doença laboral e dentro da ótica da Medicina do Viajante tem sido feita de modo muito precário e ocasional no Brasil. Os escassos estudos se restringem à análise da ocorrência de LTA entre militares submetidos a treinamento em áreas endêmicas para a enfermidade, na Amazônia e em Pernambuco. Entretanto, verificamos em nossa prática diária a ocorrência da doença em outras categorias, tais como geólogos, biólogos, engenheiros, que são enviados no exercício da profissão para atividades em áreas endêmicas. Da mesma forma, a existência de casos em pessoas que viajam a lazer não pode ser negligenciada.

O Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LapClin Vigileish) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), constitui-se em centro de referência nacional para o diagnóstico de pacientes com leishmanioses. Recebe pacientes encaminhados de unidades públicas e privadas de saúde, que não puderam ser resolutivas em relação ao problema dos pacientes, mormente para confirmação diagnóstica de casos suspeitos e para tratamento, inclusive de pacientes com falha terapêutica prévia aos medicamentos de primeira escolha ou com comorbidades que interferem no tratamento. Deste modo, um contingente expressivo de pacientes que adquiriram a infecção em outros estados tem sido atendido no LapClin Vigileish ao longo dos anos.

No presente estudo, procuramos levantar informações relacionadas às atividades e ao deslocamento das pessoas afetadas com LTA como fatores que influenciam no risco de adoecimento. Portanto, pretendeu-se estudar os pacientes atendidos no INI/Fiocruz entre 2000 e 2015 do ponto de vista dos deslocamentos e fluxo de pessoas entre diversas unidades federativas e o estado do RJ, determinando as espécies de *Leishmania* isoladas destes pacientes. Adicionalmente, o estudo visa a análise das atividades exercidas por estes pacientes segundo as categorias de risco de exposição à infecção por espécies dermatópicas de *Leishmania*.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar os casos de LC diagnosticados no Lapclin Vigileish do INI/Fiocruz, entre 2000 e 2015, sob a ótica das atividades que aumentam o risco de exposição tais como atividades profissionais, viagens e lazer.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- ✓ Descrever os casos de LC segundo gênero, faixa etária e profissão.
- ✓ Associar a transmissão de LC com residência em área endêmica e deslocamentos por motivos ligados às atividades profissionais, imigração, e lazer.
- ✓ Detalhar a LC adquirida em decorrência de deslocamentos por motivos como viagens a trabalho ou lazer, ecoturismo e imigração.

## 4 MÉTODOS

Em anexo, apresenta-se o Parecer Consolidado do Comitê de Ética em Pesquisa do INI/Fiocruz (Anexo I) e o Termo de Compromisso e Responsabilidade assinado pela doutoranda e seus orientadores (Anexo II).

A tese será apresentada na forma de dois artigos.

O primeiro artigo, “Cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil, associated with the transmission áreas”, foi submetido ao periódico Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene e responde integralmente aos objetivos 1 e 2.

O segundo artigo, “Geospatial analysis of American tegumentar leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil from 2000 to 2015: species typing and flow of travelers and migrants with leishmaniasis”, foi publicado no periódico PLOS Neglected Tropical Diseases em novembro de 2019, e responde parcialmente ao objetivo 2 e integralmente ao objetivo 3.

**4.1 Primeiro artigo:** Cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil, associated with the transmission areas

## **Cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil, associated with the transmission areas**

Mariza M Salgueiro<sup>1</sup>, Maria Inês F Pimentel<sup>1\*</sup>, Luciana F C Miranda<sup>1</sup>, Rafael R Cunha e Silva<sup>2</sup>, Liliane F A Oliveira<sup>1</sup>, Marcelo R Lyra<sup>1</sup>, Mauricio N Saheki<sup>1</sup>, Cláudia M Valete-Rosalino<sup>1</sup>, Ana Cristina C Martins<sup>1</sup>, Armando O Schubach<sup>1</sup>, Mauro C A Marzochi<sup>1</sup>, Sandro J Bedoya-Pacheco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP: 21040-900, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP: 21041-210, RJ, Brazil

\*Corresponding author

Telephone number: 55 21 3865-9541

E-mail: [maria.pimentel@ini.fiocruz.br](mailto:maria.pimentel@ini.fiocruz.br)

## Abstract

**BACKGROUND:** Cutaneous leishmaniasis may occur due to residing in endemic areas or displacements. Parasitic species differ in epidemiological and geographical contexts. **METHODS:** Retrospective cohort of 696 patients with cutaneous leishmaniasis, residents in Rio de Janeiro state, Brazil, between 2000 and 2015, studied regarding residence and displacements, with identification of the species. **RESULTS:** Transmission occurred in area of residence in 575 patients; displacements occurred due to work (52), leisure (44) and immigration (25). Most of the patients with work displacements were military personnel. More than 95% of the cases occurred in urban areas. There was territorial expansion of the endemic in Rio de Janeiro along the studied period. Most cases were concentrated in the capital and in cities surrounding the forested part of the mountain region of the state. In Rio de Janeiro municipality, disease predominated in neighborhoods surrounding massifs and forest areas of environmental preservation. *Leishmania (Viannia) braziliensis* predominated in all situations. In 16 samples, mostly associated with work displacement, other species or variants were identified. **CONCLUSIONS:** Urban areas interspersed with massifs and forest areas of environmental preservation create conditions that favor disease transmission. Our results demonstrate the geographical and epidemiological complexity of cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro.

## **Introduction**

Cutaneous leishmaniasis in Brazil has enormous diversity in the areas of transmission. In most regions where it is present, it results from the efficient adaptation of vectors to areas inhabited by humans or from the penetration of humans in areas inhabited by infected vectors.<sup>1</sup> Most studies relate the disease to populations living in endemic areas, however these areas have been expanding due to demographic and epidemiological dynamics.<sup>2</sup>

Socioeconomic, cultural and environmental conditions contribute to the expansion of the transmission areas. Exposure to the infectious vector followed by development of cutaneous leishmaniasis may arise from professional and leisure activities. There are situations in which individuals are moved to highly endemic areas due to working conditions. This has been recognized in the military contingents assigned to work in conflict regions or to training in jungle areas in various parts of the world.<sup>3-4</sup>

Occupations that can increase the risk of exposure to infection are agricultural activities in rural areas and in the interface between urban and rural areas,<sup>5</sup> biologists, geologists, gold miners.<sup>6-7</sup> Laboratory accidents in the handling of specimens may rarely result in disease.<sup>6</sup> Deforestation associated with mining, logging, expanding the agricultural frontier and handling livestock<sup>8</sup> may result in increased disease incidence in endemic areas. In Brazil, in the past decades, cutaneous leishmaniasis has been associated with deforestation for the construction of highways and railways.<sup>9</sup>

Leisure activities such as ecotourism, adventure tourism, mountaineering and others carry risks when they are performed in areas with the presence of infected vectors.<sup>10-11</sup>

A cohort of cases of cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro was studied in relation to the areas of transmission. Professional activities and displacements due to migration, work and leisure were also analyzed. The species and variants of the parasite were identified.

## **Methods**

### **Design and study group**

A retrospective cohort of patients was studied to assess the areas of transmission, professional activities and displacement due to migration, work and leisure. The species and variants

of the parasite were also identified.

### **Participating population**

The 696 studied patients were residents of the state of Rio de Janeiro, Brazil, and were diagnosed with cutaneous leishmaniasis according to clinical, epidemiological and laboratory criteria. They were attended between 2000 and 2015 at Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, which is a reference center for the disease. Cases with mucosal lesions were excluded. Clinical and epidemiological criteria included lesions (mainly ulcers with infiltrated edges, or infiltrated plaques), in exposed areas, unresponsive to local or systemic antibiotic therapy. The laboratory diagnosis included parasitological exams (culture, direct exam and histopathological exam), serology (indirect immunofluorescence reaction or ELISA), Montenegro skin test, or molecular methods (polymerase chain reaction with kDNA). The direct examination comprised the search for amastigote forms in material obtained from skin lesions and arranged in slides through imprint (compression of a fragment of a lesion collected by biopsy procedure) or smear technique.

### **Culture of clinical specimens**

In 465 patients, the diagnostic technique was parasitic isolation in culture. Briefly, fragments from cutaneous lesions were cultured in Novy-MacNeal-Nicolle medium with Schneider's *Drosophila* medium (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and the antibiotics penicillin and streptomycin. The isolated parasites were cryopreserved in liquid nitrogen (N<sub>2</sub>L). Growth of promastigote cells was performed in appropriated sterile bottles until the parasites reached the stationary phase of growth. The whole culture volume was centrifuged and the resulting pellet was submitted to three washes in NaCl EDTA buffer under centrifugation to obtain the parasite mass, which was stored in N<sub>2</sub>L until multilocus enzymatic electrophoresis (MLEE) could be performed. Samples which did not reach the ideal parasite expansion were submitted to the same protocol, and the obtained parasite masses were stored in a freezer at -20°C until DNA extraction. In addition to these samples, those with variant profiles in one or more enzymatic systems using MLEE technique were also analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), for species confirmation. Sanger sequencing of the internal transcribed spacer of ribosomal

DNA (ITS1-rDNA) was performed only in cases where it was not possible to obtain taxonomic identification through MLEE or PCR-RFLP.

### **Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)**

Identification of species was determined preferably by MLEE, which is a biochemical characterization technique based on the pH dependent electrophoretic mobility of a predefined set of proteins in a gel. MLEE was performed on 1% agarose gel supported by GE Healthcare CalBond (124 X 258 mm), using six or seven enzymatic systems: GPGDH (6-phosphogluconate dehydronegase, EC 1.1.1.43); GPI (glucose phosphate isomerase, EC 5.3.1.9); NH (nucleotidase, EC 3.2.2.1); G6PDH (glucose 6-phosphate dehydrogenase, EC 1.1.1.49); PGM (phosphoglucomutase, EC 5.4.2.2); ME (malic enzyme, EC 1.1.1.40) or MDH (malate dehydrogenase, EC 1.1.1.37). The MDH enzymatic system was used only when variant profiles were detected in the other enzymatic systems. Isoenzyme electrophoresis was performed with the reference strain of *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/M2903) If any sample presented a different profile, a new assay was performed with the other reference strains: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/19767/PH8), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) shawi* (MCED/BR/1984/M8408), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), and *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75). Analysis of gel bands was performed qualitatively, by visual comparison of the sample band with the default reference strains.

### **Polymerase chain reaction (PCR)**

DNA extraction from the parasite masses was performed using a DNAzol Reagent kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), following the manufacturer's recommendations. PCR assays were performed using the primers 5'GGACGAGATCGAGCGCATGGT3' and 5'TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG3', to amplify a 234-bp fragment of the gene region encoding hsp70C. The amplification products were separated using 2% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide (0.5 µg / mL) and visualized under ultraviolet light.

### **Restriction fragment length polymorphism (RFLP)**

Amplification products obtained by PCR were digested with two restriction enzymes, *HaeIII*

(Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) and *Bst*UI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), following the manufacturer's recommendations. The fragments obtained by enzymatic digestion were separated on a 12.5% polyacrylamide gel and stained with silver, and bands were compared with a DNA fragment size marker (100-bp DNA ladder). The banding pattern was compared with the reference strains: *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426), and *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533).

### **Sequencing**

The ITS1-rDNA was amplified by conventional PCR using the primers L5.8S: 50-TGATACCACTTATCGCACTT-30 and LITSR: 50-CTGGATCATTTCGGATG-30. Amplification reactions were performed in volumes of 50 µL. Amplicons from the PCR positive samples (300–350 bp, depending on the species) were visualized on a 2% agarose gel and purified using the Wizard SV Gel kit and PCR Clean-up System kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA). The products were then sequenced with the same primers used in the PCR assay. Sequencing was performed on an automated sequencer at Plataforma de Sequenciamento Genômico ABI-3730 (Oswaldo Cruz Institute / Fiocruz). Sequence alignment was performed using SeqMan Pro (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) and comparisons were conducted with *Leishmania* reference strains sequences obtained from the GenBank database. Phylogenetics analyses with the evolutionary history was inferred using the maximum likelihood method based on the Jukes–Cantor model, and the sequences were aligned using Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) version 6 (Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan; Arizona State University, Arizona, USA; King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia). This same software was used to calculate a distance matrix and the genetic distance percentage between the test samples and reference strains of *Leishmania* spp.

### **Map construction**

The maps were constructed using vector files from the state and municipalities of Rio de Janeiro obtained from the website of the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). The neighbourhood files were obtained from the Pereira Passos Institute (IPP) website, both databases

referring to the year 2015. Data geoprocessing was performed using the open software Quantum GIS (QGIS) version 3.10.2 (QGIS development team, version 3.10 LTR, La Coruña). The maps were developed to represent the spatial distribution of autochthonous cases in different municipalities in the state and in different neighbourhoods in the city of Rio de Janeiro.

### **Professional activities and displacements due to work and leisure**

Medical records were reviewed to obtain patient data, such as age, sex, profession, home address, area of infection and information on travel. Professional activities were grouped according to the Ministry of Labor of Brazil. The category “restricted to home” included children of preschool age, home workers, retirees and other conditions that conditioned them to remain at home.

Regarding the area of transmission, patients were classified into three categories:

1. Residents in the state of Rio de Janeiro where the infection occurred.
2. Infections due to displacement related to work.
3. Infections in immigrants from other states.
4. Infections due to leisure travel.

## **Results**

Of the 696 patients with cutaneous leishmaniasis, 257 (36.9%) were women and 439 (63.1%) men. Age ranged from 1 to 92 years (mean 35.9 years, SD 19.2). In women, the mean was 37.1 years (SD: 20.7 years) and in men, the mean was 35.2 years (SD: 18.3 years). There were no significant differences between age in relation to sex ( $p = 0.17$ ; 95% CI = -4,964; 0.911).

Table 1 shows the patients grouped according to the place of transmission: residents in endemic areas, and displacements due to work, migration and leisure. The group in which the infection was considered to have occurred in the geographical area of residence was the majority, with 575 patients (82.6%). This group had the greatest diversity of professions, with a predominance of individuals restricted to home, students and general service workers. The second group, related to transmission due to displacement, had 121 patients (17.4%). Displacement for work reasons included 52 patients (7.5%), mainly military (52% of the group) and work activities considered to be at higher risk of exposure to infection (19%). The latter included the categories of biologist in fieldwork,

environmental analyst, forest engineer, geologist, geotechnician, reforestation worker, oil technician, topographer and quarry worker. We also had a cinematographer and a professional mountaineer who work in endemic areas.

Most of the military personnel were stationed in an endemic area, and a part of them participated in command training in the Amazonian jungle. The infected people who migrated from an endemic area to Rio de Janeiro comprised 25 patients (3.6%) and 44 patients (6.3%) had displacements due to leisure travel.

Table 1 shows that males predominated in most professional categories.

In 231 (33.2%) samples it was not possible to identify the parasitic species, due to contamination by fungi and bacteria or due to the lack of growth in culture after cryopreservation. In 465 samples it was possible to characterize different species of *Leishmania*, and, in five samples, genetic variants. *L. (V.) braziliensis* was the predominant species (Table 2). Almost all infections where transmission occurred in areas of residence were due to *L. (V.) braziliensis*. Variant of *L. (V.) braziliensis* was found in one of the individuals residing in Rio de Janeiro and in three imported cases in individuals who were infected due to working conditions. In 12 samples *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* and variant of *L. (V.) naiffi* were identified. Most of the samples which were not *L. (V.) braziliensis* were associated with displacement due to work reasons in areas with the presence of sand fly vectors and reservoirs (13 out of 16 samples), with the military representing 8 of those cases.

The geographic distribution of autochthonous cases showed that more than 95% of infections in the affected municipalities were in urban areas (Figure 1). Over the 16 studied years, the territory of the state of Rio de Janeiro was progressively affected (Figure 2). Out of the 92 cities (municipalities) in the state of Rio de Janeiro, cases of cutaneous leishmaniasis were found in 47, which corresponds to 22,563 km<sup>2</sup> (51%) of the territory (Figure 3A). In the state most of the cases were concentrated in the municipalities that surround the forested part of the mountainous region and the Serra da Bocaina National Park in the southern region of the state.

In the city of Rio de Janeiro, there were patients in 15 of the 162 neighbourhoods, which correspond to approximately 50% of the territory (Figure 3B). Most of these infections occurred in the neighbourhoods surrounding some massifs and forest areas of environmental preservation. More specifically, the neighbourhoods that showed the greatest transmission surround the massifs and

State Parks of Pedra Branca and Gericinó-Mendanha. Other cases in the city corresponded to areas close to Baixada de Jacarepaguá urban parks. We also had a case in Gávea, which is close to the forested area of the Tijuca massif.

## Discussion

One of the gaps in the epidemiology of human infection with cutaneous leishmaniasis is related to the risk of transmission in human activities in each context. Our results show that, in the state of Rio de Janeiro, Brazil, most infections are autochthonous and occur in the areas where individuals live, and a much smaller proportion occurs in conditions of displacement due to work, migration or leisure reasons.

The extensive transmission area in the state of Rio de Janeiro was distributed predominantly in urban areas. In the past, the endemic disease in Brazil had a mainly rural character,<sup>9</sup> which still happens in part of the north and northeast of the country.<sup>5</sup> Rio de Janeiro seems to resemble states in the south and southeast regions.<sup>12</sup>

Most of the cases in the city of Rio de Janeiro were in neighbourhoods that surround some massifs and forest areas of environmental preservation. This also happened in the municipalities of the mountainous region of the state of Rio de Janeiro, with other areas being occasionally affected. The historical trend of the disease in Rio de Janeiro shows an increase in peripheral areas.<sup>1,13</sup> Kawa and Sabroza<sup>13</sup> raised the hypothesis of spatial units with differentiated risks, arguing that the urbanization of the city created conditions for the establishment of well-defined foci with a greater possibility of contact between susceptible individuals and vectors. This could be translated as the existence of areas free of infestation interspersed with microhabitats close to areas of environmental preservation.

Men predominated in most of the studied work activities. There seems to be a balanced distribution between sexes when the probability of transmission is homogeneous, as occurs in infections in the habitation areas.<sup>14</sup> When transmission is related to working conditions, it tends to follow a distribution close to the occupation. In the military and farmers, categories mostly comprised of men, the resulting infections predominate in this genre.<sup>5,12,15</sup> However, there are reports in the literature that suggest that men are more susceptible to the disease, in which biological factors are

involved.<sup>16</sup>

The most important working group in the rural area was that of farmers. They accounted for almost ten percent of our sample and most lived close to work areas. Agricultural activities where infected reservoirs and sand flies are present have been related to the risk of transmission of cutaneous leishmaniasis.<sup>5,17</sup> Sand flies of different species have already been found in coffee plantations, sugar cane and other agricultural areas.<sup>18,19</sup> The amount of sand flies found in these areas can vary depending on climatic conditions such as temperature, humidity and rainfall.<sup>18</sup> Phlebotomines involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in areas with fruit tree plantations have already been documented in Rio de Janeiro.<sup>20</sup>

Preventive measures for farmers must be implemented early and continuously.<sup>15</sup> Rural households should be built at a distance from the cultivation sites.<sup>19</sup> The difficulty of access added to the cost of transportation and the need to suspend work are additional troubles. The problem is often not solved in regional health units and patients are referred to other facilities. These difficulties translate into delayed diagnosis with possible worsening of the condition. Perception studies of the disease carried out in a portion of these patients showed that the majority were unaware of the transmission mechanism.<sup>21</sup> The way in which the affected individuals perceive the illness process and the health professionals identify the risk of transmission plays a fundamental role in the development of efficient strategies for health control and promotion.<sup>21</sup>

Military personnel accounted for the largest proportion of patients exposed to transmission due to working conditions. Many of them are moved to endemic areas to perform command exercises in the jungle. Previous studies show high proportions of the disease, reaching up to 25% of the exposed military personnel.<sup>3,4</sup> Protection measures, such as the use of long sleeves, mosquito nets and beds treated with insecticides are used against the risk of transmission in these populations.<sup>22</sup> The very nature of military training in the jungle often makes it difficult to properly use these measures,<sup>11</sup> which are not always efficient,<sup>23</sup> possibly due to permanent exposure. In Brazil, there are few studies related to the involvement of military personnel in endemic areas. Guerra and collaborators<sup>24</sup> described 48 military personnel diagnosed with ATL after exercises in the Amazon rainforest, with parasitological confirmation by smear of the lesions in 89.6% of the cases. Entomological studies in military training bases in Amazon have detected a great diversity of sandflies,<sup>25</sup> showing the risk of exposure to infection. In Pernambuco, a positivity of 25.3% was found for Montenegro skin test; most of these

soldiers (94.7%) reported the use of protective measures.<sup>23</sup>

Among our cases, we verified the existence of different professions that, in the literature, are considered to be at risk because they increase the probability of transmission due to penetration in areas with a high concentration of infected vectors.<sup>6,7</sup>

Although they are still neglected, the measures for the prevention and control of leishmaniasis related to working conditions belong to the medicine of the worker area. Surveillance actions, periodic assessments and provision of appropriate equipment are the responsibility of the companies, institutions and responsible authorities.

Our results reinforce the notion that cutaneous leishmaniasis is also a disease related to tourism and leisure. Almost 7% of our sample had illness related to travel to endemic areas. Ecotourism and adventure tourism in forest areas in Latin America have stood out as a risk and are included in recommendation guides for travellers.<sup>10</sup> In general, the hypothesis of cutaneous leishmaniasis should be considered in tourists in endemic regions that return with lesions that do not heal. The increase of the disease in travelers has encouraged the formation of committees to elaborate specific recommendations.<sup>26</sup> Once cutaneous leishmaniasis is confirmed, treatment can be directed by the geographical area of origin of the infection, however it is recommended that the species be identified and that the treatment should be directed to the etiologic agent.<sup>26</sup> The availability of medications, the need for hospitalization and the recommendations of the referral centers must be taken into account. Counseling before travel is important to prevent the occurrence of the disease,<sup>27</sup> particularly regarding the use of repellents and protective screens.

The results of species characterization were compatible with the literature. Genetic studies of *Leishmania* populations show a great diversity of species and variants in the Amazon<sup>28</sup> and in northeastern Brazil.<sup>29</sup> In Rio de Janeiro, like other states in the southeastern region of Brazil, *L. (V.) braziliensis* is largely prevalent.<sup>30</sup> Most of the species in our series were found only in conditions of displacement, especially due to work, as in the case of military personnel who participated in command training in the jungle. Although *L. (V.) braziliensis* is considered to be a genetically homogeneous species, its behavior appears to differ between geographic regions.<sup>30</sup> We have identified variants of this species in imported cases and in an autochthonous case in Rio de Janeiro. It is difficult to predict the impact of the introduced parasitic diversity and whether they will adapt to space units in the territory of Rio de Janeiro.

The limitations of the study, regarding the results of characterization of species and variants, are the high proportion of sample losses for different reasons (absence of growth in culture after cryopreservation, contamination by fungi and bacteria); and, regarding the analyses in general, the fact that the population attended at INI / Fiocruz represents about 40% of infections in the state of RJ.

## **Conclusion**

The majority of cutaneous leishmaniasis infections in our study occurred in the areas where the individuals lived, and a minority occurred due to displacement due to immigration, work and leisure travels. Urban areas interspersed with massifs and forest areas of environmental preservation create conditions that favour the transmission of the disease, making control difficult. Our results demonstrate the geographical and epidemiological complexity of cutaneous leishmaniasis in the territory of Rio de Janeiro. It is necessary to develop spatial studies that consider the territorial dynamics with the participation of the vector and men, that take into account the geographical, biological and social characteristics.

## **Authors' contributions**

MMS, MIFP and SJBP conceived the study; MIFP and SJBP designed the study protocol. MMS, MIFP, LFCM, and SJBP retrieved epidemiological and clinical data, RRCS performed geocodification and LFCM performed species characterization. MIFP and SJBP analyzed and interpreted these data. MIFP and SJBP drafted the manuscript; MMS, MIFP, LFCM, RRCS, LFAO, MRL, MNS, CMVR, ACCM, AOS, MCAM and SJBP critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript. MIFP and SJBP are the guarantors of the paper.

## **Funding**

This study was funded by Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant number 001. It was also funded by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do

Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)/ CNE E-26/202.911/2015 (AOS) and National Council for Scientific and Technological Development - CNPq/ 304.335/2014-2 (AOS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Competing interests

None declared.

## Ethical approval

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, under number CAAE 61114116.4.0000.5262.

## References

1. Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pública*. 1994;10(Supl 2):359-75.
2. Bedoya-Pacheco SJ, Araujo-Melo MH, Valette-Rosalino CM et al. Endemic tegumentary leishmaniasis in Brazil: correlation between level of endemicity and number of cases of mucosal disease. *Am J Trop Med Hyg*.2011;84:901-5.
3. Van Thiel PP, Zeegelaar JE, Van Gool T et al. Cutaneous leishmaniasis in three Dutch military cohorts following jungle training in Belize. *Travel Med Infect Dis*.2011;9:153e160.
4. Oré M, Sáenz E, Cabrera R et al. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Peruvian military personnel undertaking training activities in the Amazon Basin, 2010. *Am J Trop Med Hyg*.2015;93:340–6.
5. Araujo AR., Portela NC, Feitosa AP et al. Risk factors associated with American cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;58:86.
6. Brito ME, Andrade MS, Almeida EL et al. Occupationally acquired American cutaneous leishmaniasis. *Case Rep Dermatol Med*. 2012;2012:279517.
7. Soares L, Abad-Franch F, Ferraz G. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Central Amazonia: a comparison of sex-biased incidence among rural settlers and field biologists. *Trop Med Internat Health*.2014;19:9888-95.
8. Hernández AM, Gutierrez JD, Xiao Y et al. Spatial epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: socioeconomic and demographic factors associated with a growing epidemic. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.2019;113:560-8.

9. Temponi AOD, Brito MG, Ferraz ML et al. Ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar americana: uma análise multivariada dos circuitos espaciais de produção, Minas Gerais, Brasil, 2007 a 2011. Cad Saúde Pública.2018;34:e00165716.
10. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Cascio A. Leishmaniasis in travelers: a literature review. Travel Med Infect Dis.2014;12:563-81.
11. Vanbrabant P, van den Broucke S, Soentjens P. Cutaneous ulcer after a stay in the tropics. Neth J Med.2015;73:44.
12. Detoni MB, Lima DM, Silva TP et al. Temporal and spatial distribution of American tegumentary leishmaniasis in north Paraná: 2010–2015. Rev Soc Bras Med Trop.2019;52:e20180119.
13. Kawa H, Sabroza PC. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. Cad Saude Publica.2002;18(3):853-65.
14. Monteiro WM, Neitzke-Abreu HC, Ferreira ME et al. Population mobility and production of American tegumentary leishmaniasis in the state of Parana, southern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop.2009;42:509–14.
15. Eid D, Guzman-Rivero M, Rojas E et al. Risk factors for cutaneous leishmaniasis in the rainforest of Bolivia: a cross-sectional study. Trop Med Health.2018;46:9.
16. Lockard RD, Wilson ME, Rodriguez NE. Sex-related differences in immune response and symptomatic manifestations to infection with *Leishmania* species. J Immunol Res.2019;2019:4103819.
17. Pedrosa FA, Ximenes RA. Sociodemographic and environmental risk factors for American cutaneous leishmaniasis (ACL) in the State of Alagoas, Brazil. Am J Trop Med Hyg.2009;81:195-201.
18. Miranda DE, Sales KG, Faustino MA et al. Ecology of sand flies in a low-density residential rural area, with mixed forest/agricultural exploitation, in north-eastern Brazil. Acta Trop.2015;146:89-94.
19. Moreno M, Guzmán-Rodríguez L, Valderrama-Ardila C et al. Land use in relation to composition and abundance of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in five foci of domiciliar transmission of cutaneous leishmaniasis in the Andean region of Colombia. Acta Trop.2020;203:105315.
20. Souza NA, Andrade-Coêlho CA, Vilela ML, Rangel EF. The Phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two Atlantic rain forest reserves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz.2001;96:319-24.
21. Martins ACC, Nunes JA, Bedoya-Pacheco SJ, Souza CTV. Perception risk of transmission of zoonoses in a reference center. Rev Eletron de Comun Inf Inov Saúde.2015;9(3):1-14.
22. Lightburn E, Meynard JB, Morand JJ, et al. Surveillance épidémiologique des leishmanioses tégumentaires en Guyane. Synthèse de données militaires sur 10 ans. Med Trop (Mars). 2002;62:545-53.
23. Andrade MS, Brito MEF, Silva ST, et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop.2005;388(3):229-33.
24. Guerra JAO, Talhari S, Paes MG et al. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. Rev Soc Bras Med Trop.2003;36:587-90.
25. Gomes LHM, Albuquerque MIC, Rocha LC et al. Diversity and distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a military area in the state of Amazonas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz.2013;108(5):651-656.
26. Blum J, Buffet P, Visser L, et al. LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014. J Travel Med.2014;21:116-29.
27. Savoia, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries.2015;9:588-96.

28. Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, et al. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health*.2006;11(9):1388–98.
29. Brito MEF, Andrade MS, Mendonça MG et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of Northeastern Brazil. *Trop Med Int Health*.2009;14(10):1278-86.
30. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol*.2003;41(7):3126-32.

## **Tables and Figure legends:**

Table 1. Distribution of the patients according to likely local of transmission of cutaneous leishmaniasis, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 to 2015.

Table 2. Distribution of the parasite species in the studied patients according to likely local of transmission of cutaneous leishmaniasis, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 to 2015.

Figure 1. Distribution of the cases of cutaneous leishmaniasis in the cities of the state of Rio de Janeiro, Brazil, according to the transmission in urban, periurban and rural areas. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 to 2015.

Figure 2. Distribution of the cases of cutaneous leishmaniasis in the cities of the state of Rio de Janeiro, Brazil, according to the quadrennium of the occurrence. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 to 2015.

Figure 3. Distribution of the cases of cutaneous leishmaniasis according to area of transmission in cities of the state of Rio de Janeiro (A) and the neighbourhoods of the municipality of Rio de Janeiro (B). Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 to 2015.

**Table 1. Distribution of the patients according to likely local of transmission of cutaneous leishmaniasis, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 to 2015.**

Professions	Patients			Local of transmission n (%)			
	n	%	Men	Residents	Displacements – 121 (17,4%)		
				in the area 575 (82.6%)	Work 52 (7.5%)	Migration 25 (3.6%)	Leisure 44 (6.3%)
Administrative	18	2.6	67%	11 (1.9)	-	1 (4.0)	6 (13.6)
Agriculture	58	8.3	91%	53 (9.2)	2 (3.8)	1 (4.0)	2 (4.5)
Autonomous worker	8	1.1	88%	8 (1.4)	-	-	-
Biologist	3	0.4	67%	1 (0.2)	2 (3.8)	-	-
Cinematographer	1	0.1	100%	-	1 (1.9)	-	-
Commerce	32	4.6	66%	28 (4.9)	-	2 (8.0)	2 (4.5)
Construction	47	6.8	98%	40 (7.0)	4 (7.7)	2 (8.0)	1 (2.3)
Drivers and highway workers	29	4.2	97%	25 (4.3)	1 (1.9)	2 (8.0)	1 (2.3)
Environment analyst	1	0.1	100%	-	1 (1.9)	-	-
Forest engineer	1	0.1	-	-	1 (1.9)	-	-
General services worker	96	13.8	59%	86 (15.0)	3 (5.8)	3 (12.0)	4 (9.1)
Geologist	1	0.1	100%	-	1 (1.9)	-	-
Geotechnical	1	0.1	100%	-	1 (1.9)	-	-
Health professionals	8	1.1	13%	5 (0.9)	2 (3.8)	-	1 (2.3)
Home-keeping	7	1.0	86%	6 (1.0)	-	-	1 (2.3)
Industry worker	12	1.7	67%	12 (2.1)	-	-	-
Military personnel	38	5.5	100%	9 (1.6)	27 (51.9)	-	2 (4.5)
Miner	1	0.1	100%	1 (0.2)	-	-	-
Mountaineer	1	0.1	100%	-	1 (1.9)	-	-
Not reported	8	1.1	63%	5 (0.9)	-	2 (8.0)	1 (2.3)
Oil technician	1	0.1	100%	-	1 (1.9)	-	-
Police	2	0.3	100%	1 (0.2)	-	-	1 (2.3)
Professionals	28	4.0	46%	18 (3.1)	3 (5.8)	-	7 (15.9)
Quarry worker	1	0.1	100%	1 (0.2)	-	-	-
Reforestation worker	2	0.3	100%	1 (0.2)	1 (1.9)	-	-
Restricted to the house	150	21.6	25%	137 (23.8)	-	9 (36.0)	4 (9.1)
Security worker	5	0.7	100%	5 (0.9)	-	-	-
Students	135	19.4	64%	121 (21.0)	-	3 (12.0)	11 (25.0)
Topographer	1	0.1	100%	1 (0.2)	-	-	-
<b>Total</b>	<b>696</b>	<b>100.0</b>	<b>63%</b>	<b>575 (100.0)</b>	<b>52 (100.0)</b>	<b>25 (100.0)</b>	<b>44 (100.0)</b>

**Table 2. Distribution of the parasite species in the studied patients according to likely local of transmission of cutaneous leishmaniasis, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000 to 2015.**

Parasite species	Local of transmission n (%)				Total
	Residents	Displacements			
	in the area	Work	Migration	Leisure	
	<b>575</b>	<b>52 (7.5%)</b>	<b>25 (3.6%)</b>	<b>44 (6.3%)</b>	
<i>L. (L.) amazonensis</i>	-	1 (3.1)	-	-	1 (0.2)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	400 (99.8)	19 (59.4)	15 (100.0)	15 (88.2)	449 (96.5)
<i>L. (V.) braziliensis</i> (variant)	1 (0.2)	3 (9.4)	-	-	4 (0.9)
<i>L. (V.) guyanensis</i>	-	3 (9.4)	-	2 (11.8)	5 (1.1)
<i>L. naiffi</i>	-	5 (15.6)	-	-	5 (1.1)
<i>L. naiffi</i> (variant)	-	1 (3.1)	-	-	1 (0.2)
<b>Total</b>	<b>401 (100.0)</b>	<b>32 (100.0)</b>	<b>15 (100.0)</b>	<b>17 (100.0)</b>	<b>465 (100.0)</b>
<i>Uncharacterized proportion</i>	174 (30.3)	20 (38.5)	10 (40.0)	27 (61.4)	231 (33.2)

Figure 1:

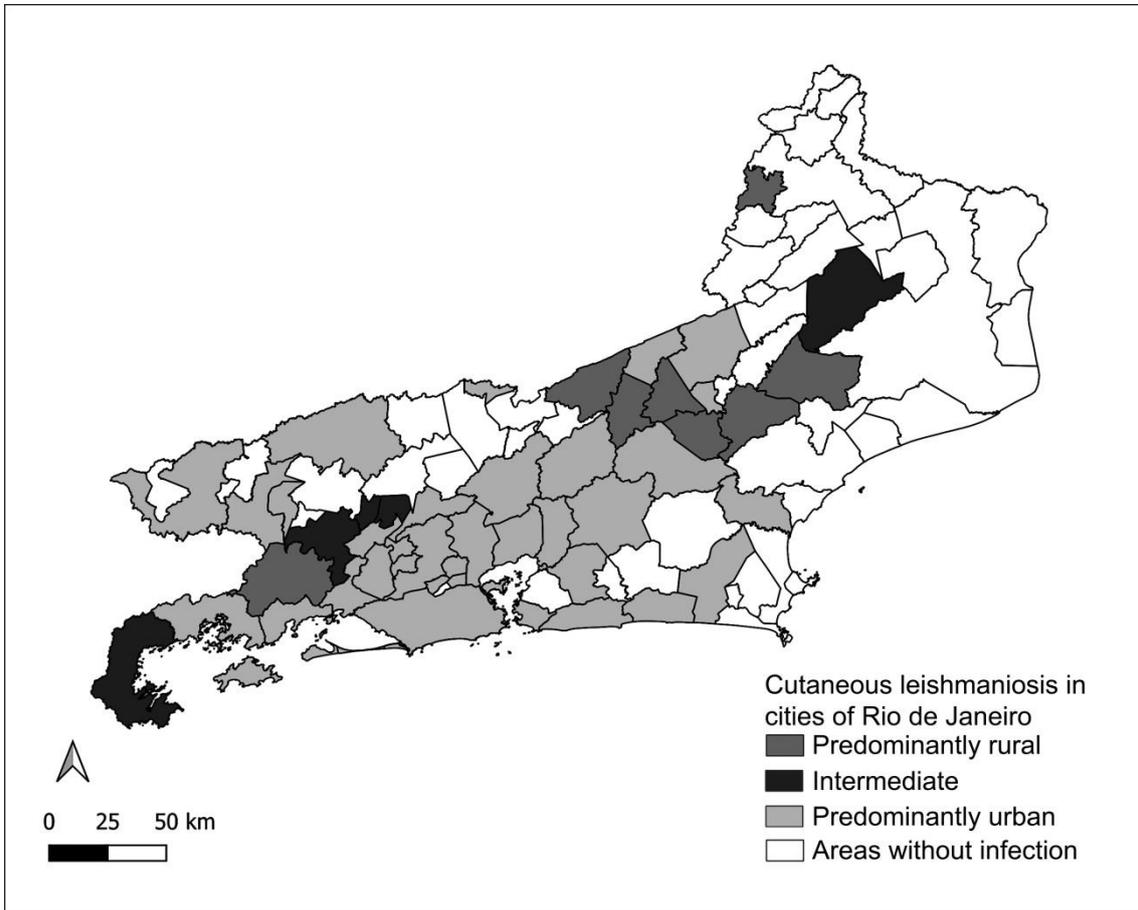


Figure 2:

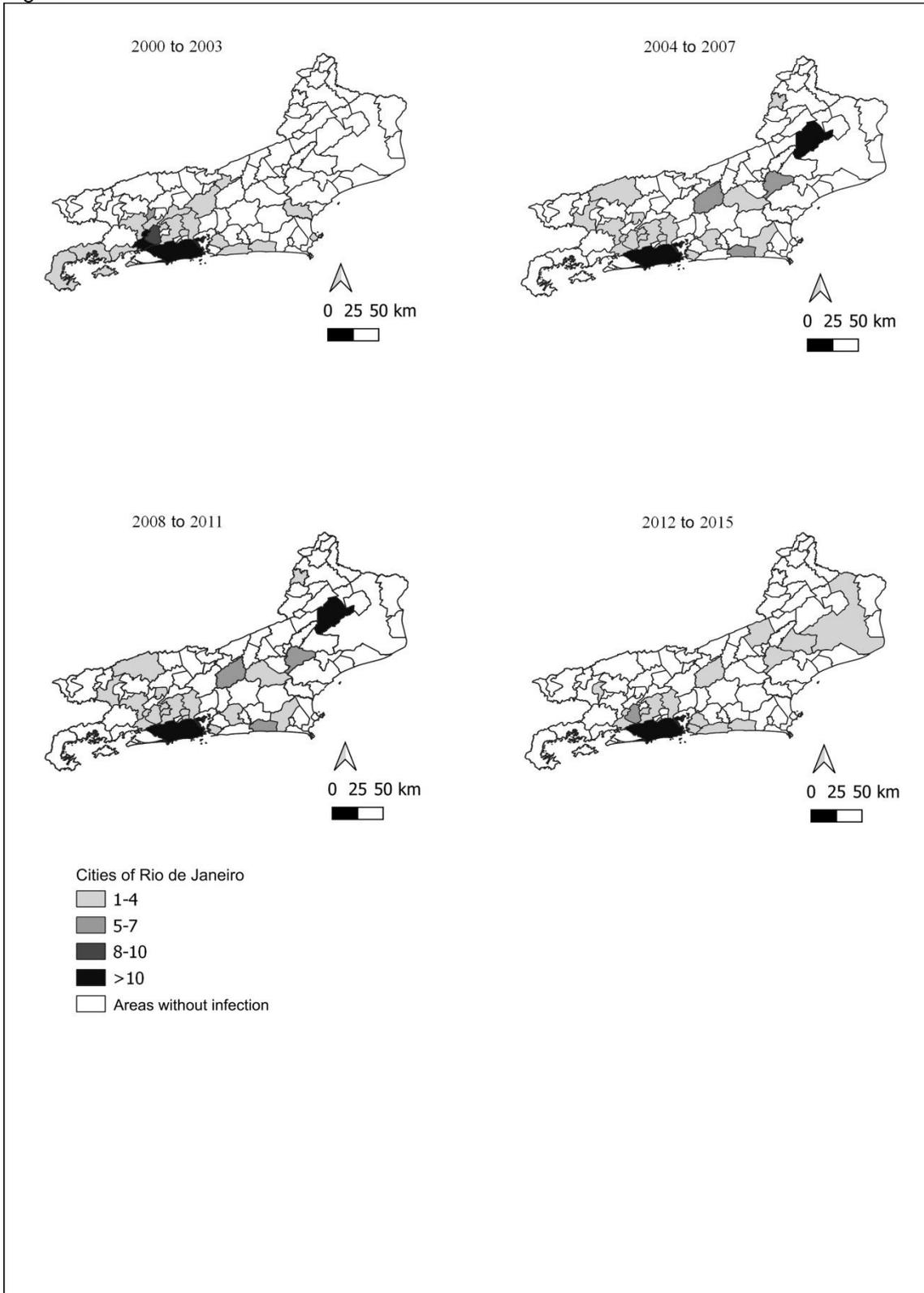
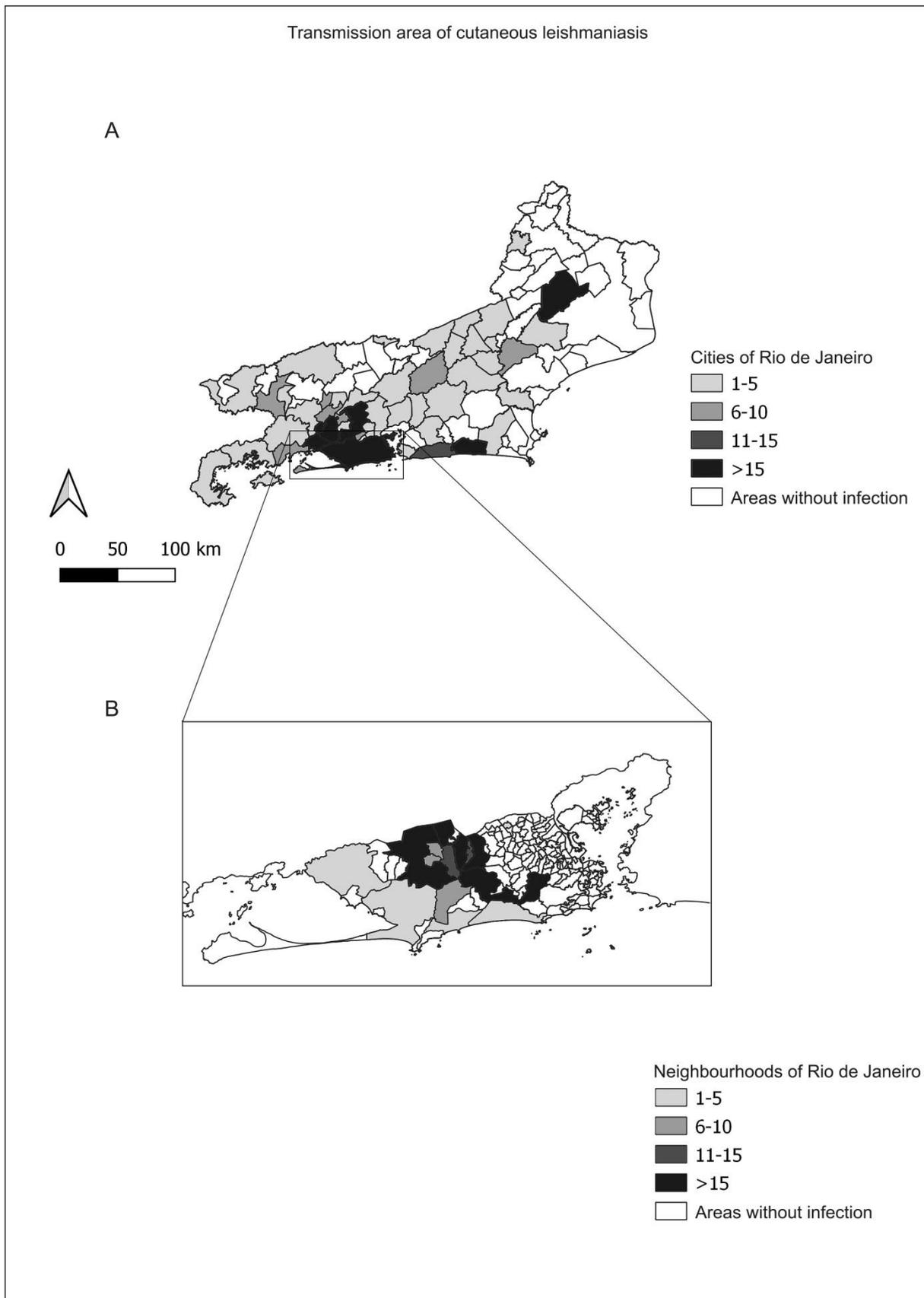


Figure 3:



## 4.2 Segundo artigo: Geospatial analysis of American tegumentar leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil from 2000 to 2015: Species typing and flow of travelers and migrants with leishmaniasis

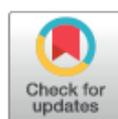
### RESEARCH ARTICLE

# Geospatial analysis of tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil from 2000 to 2015: Species typing and flow of travelers and migrants with leishmaniasis

Luciana de Freitas Campos Miranda<sup>1\*</sup>, Raquel da Silva Pacheco<sup>1</sup>, Maria Inês Fernandes Pimentel<sup>1</sup>, Mariza de Matos Salgueiro<sup>1</sup>, Aline Fagundes da Silva<sup>1</sup>, Cíntia Xavier de Mello<sup>2</sup>, Juliana Helena da Silva Barros<sup>3</sup>, Claudia Maria Valet-Rosalino<sup>1</sup>, Maria de Fátima Madeira<sup>1</sup>, Samanta Cristina das Chagas Xavier<sup>3</sup>, Armando de Oliveira Schubach<sup>1</sup>

**1** Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **2** Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **3** Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

\* [luciana.freitas@ini.fiocruz.br](mailto:luciana.freitas@ini.fiocruz.br)



### OPEN ACCESS

**Citation:** Miranda LdFC, Pacheco RdS, Pimentel MIF, Salgueiro MdM, da Silva AF, de Mello CX, et al. (2019) Geospatial analysis of tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil from 2000 to 2015: Species typing and flow of travelers and migrants with leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 13(11): e0007748. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748>

**Editor:** Ananias A. Escalante, Temple University, UNITED STATES

**Received:** January 8, 2019

**Accepted:** September 4, 2019

**Published:** November 15, 2019

**Copyright:** © 2019 Miranda et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

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

**Funding:** This study was funded by grants from Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)/CNE E-26/202.91.1/2015 (ADS) and J/CNE E-26/201.537/2014 (MFM) and National Council for Scientific and Technological Development - CNPq/485.333/

## Abstract

### Background

We identified the species of *Leishmania* isolated from traveling and migrant patients attended in a reference center from 2000 to 2015, we performed the georeferencing of these species in Rio de Janeiro (RJ) state and we had knowledge about the human flows between the likely location of infection (LLI) and place of residence (PR) in RJ state, Brazil.

### Methodology/Principal findings

This is a retrospective cross-sectional study including 171 patients diagnosed with ATL. Google Maps, OpenStreetMap, and Bing Maps were tools used to georeference LLI and PR. For etiological identification, we used isoenzyme electrophoresis, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (molecular target *hsp70C* with restriction enzymes *Hae*III and *Bst*UI), and sequencing of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. ARCGIS software was used to create maps of the geographic distribution of *Leishmania* species in the state and municipality of RJ, together with flows between the LLI and PR. Isolates from 104 patients were identified as: *L. (Viannia) braziliensis* (80.8%), *L. (V.) naiffi* (7.7%), *L. (V.) guyanensis* (6.7%), *L. (Leishmania) amazonensis* (1%), and genetic variants of *L. (V.) braziliensis* (3.8%). The flow maps showed that the LLI included 4 countries, 19 Brazilian states, and 18 municipalities of RJ state. The Brazilian states with the highest density of cases were Amazonas (n = 32), Bahia (n = 18), and Ceará (n = 15).

### Conclusions/Significance

This work is the first contribution to the knowledge of the routes of *Leishmania* species introduced in RJ state by migrants and travelers patients. *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*,

2013-9 (AOS) and 304.335/2014-2 (AOS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

*L. (V.) naiffi*, *L. (L.) amazonensis*, and genetic variants of *L. (V.) braziliensis* were identified in RJ state. To determine whether the autochthonous transmission of these imported species is possible it is necessary the adaptation of these species to environmental conditions as well as the presence of reservoirs and phlebotomine vectors in this region.

### Author summary

Leishmaniasis is one of the most important neglected parasitic diseases in humans worldwide. American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which are injected into the skin by small insects known by sandflies. Many different *Leishmania* species may cause ATL, which can affect the skin and/or oral and nasal mucosa. In this study, we analyzed flows between the likely location of infection (LLI) and the place of residence (PR) in Rio de Janeiro (RJ) state and identified *Leishmania* species isolated from travelers and migrants attended between 2000 and 2015 in a reference hospital for the care of patients with ATL. This work is the first contribution to knowledge about the routes of *Leishmania* species introduced to RJ state by migrant and traveling patients. In addition to *Leishmania (Viannia) braziliensis*, which was the most common species, other species have also been introduced to RJ state, including *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (Leishmania) amazonensis*, and genetic variants of *L. (V.) braziliensis*. Knowledge of the migratory flow and geographic location of these imported *Leishmania* species may contribute to the surveillance and control of ATL in RJ state, Brazil.

### Introduction

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a vector-borne disease, caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania* and it is one of the most important infectious diseases worldwide, especially in countries with poor socioeconomic conditions [1]. In Brazil, the main clinical presentations of ATL are cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (ML), and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). CL is the most common clinical form and ML is the most severe form, although it is rarely fatal [2].

Currently, approximately 53 *Leishmania* species have been described worldwide, of which, 31 species are known to be parasites of mammals and 20 species are pathogenic for human beings [3]. In Brazil, seven species of dermatropic *Leishmania* are described: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, and *L. (V.) braziliensis*, the species with the highest prevalence. The geographical distribution of ATL is associated with the dispersion of vectors. There are approximately 1,000 valid described species of sandflies in the world of which 530 are known to occur in the Americas [4]. In Rio de Janeiro (RJ) state, the main vector is *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, with *Lu. migonei* being considered as secondary vector. Other potential vector species were recorded in endemic areas of RJ state, such as *Lu. (N.) whitmani*, *Lu. (N.) flaviscutellata*, *Lu. (Pintomyia) fischeri* and *Lu. (P.) pessoai* [5]. Moreover, there are other vectors of some non-endemic species in RJ state. Therefore, if some non-endemic *Leishmania* also exists in the same region, autochthonous transmission is possible.

In Brazil, ATL was initially considered a zoonosis of wild animals, which occasionally affected people in contact with forests, in this case being considered as anthrozoosis.

However, environmental changes caused by human beings have modified the epidemiological profile of leishmaniasis in some regions, where sandflies vectors have adapted to the domestic and peridomestic environment and domestic animals also participate in this cycle [6].

Many methods have been described for typing *Leishmania* species in clinical or cultured samples. Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) is the basis of current *Leishmania* taxonomy and is still considered to be the gold standard for parasite typing, despite being a time-consuming method that is only applicable to cultured parasites [7,8]. Using molecular tools such as polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of the gene encoding the heat shock protein hsp70, it is possible to identify *Leishmania* species in samples that are difficult to grow in culture. This target has been used to identify *Leishmania* species from the Old and New World [9,10]. In this technique, the amplicons are subjected to restriction enzyme digestion to discriminate the main species of pathogenic *Leishmania* in Brazil: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, and *L. (L.) infantum* [10,11]. Another alternative for taxonomic classification is Sanger sequencing of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA (ITS1-rDNA). This target is used in phylogenetic studies and classification of species of the genus *Leishmania* [12–14].

The state of RJ, located on the coast in the Southeast Region of Brazil, is the third most populous state in the country, with about 17 million inhabitants and a large influx of tourists [15]. Between 2001 and 2015, 202,164 cases of ATL were reported in Brazil, of which 1,620 (0.8%) were in Rio de Janeiro (RJ) state [16]. In this state, ATL is caused almost exclusively by *L. (V.) braziliensis*, although an autochthonous case of diffuse CL caused by *L. (L.) amazonensis* has been recorded [17] and two cases of human infection with *L. (L.) infantum*, whose only clinical manifestation was the presence of skin lesions typical of ATL, without visceral involvement [18,19]. Additionally, cases of mixed infection with *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis* have been detected in humans and dogs [20–22].

Geographic information systems (GIS) are spatial analysis tools that allow for the integration of host, vector, parasite, and environmental data, to understand the transmission patterns and epidemiology of leishmaniasis, Chagas disease, malaria, dengue, and other infectious diseases, as well as their spatiotemporal distribution [23–26]. The epidemiological complexity of ATL is evidenced by the diversity of *Leishmania* species, reservoirs, and vectors involved in the transmission cycle. The identification and monitoring of territorial units of epidemiological significance, as well as knowledge of the spatial distribution of leishmaniasis cases and the species involved, may help to guide control measures [2].

In recent decades, there has been an increase in the number of imported cases of leishmaniasis, which is associated with increased tourism, military training, and migratory flows from endemic areas [27,28]. Travelers can play an important role in the spread of infectious diseases. The greater the flow of migrants and travelers, the greater the likelihood of introducing infectious diseases into their destination regions. However, in the case of leishmaniasis the spread of the disease is also related to the presence of their respective phlebotomine vectors.

The Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation (NIID/FIOCRUZ) located in Rio de Janeiro municipality is responsible for the care and diagnosis of 25% of the ATL cases reported in RJ state, including about 75% of the more serious cases, such as ML or relapses [29]. In Brazil, the identification of the causative species of ATL is not routinely performed. However, it is believed that in RJ state, ATL is caused almost exclusively by *L. (V.) braziliensis*. In the present study, we identified the species of *Leishmania* isolated from traveling and migrant patients attended at the NIID/FIOCRUZ reference center from 2000 to 2015, we performed the georeferencing of these species in RJ state and taking into account the human flows between the likely location of infection (LLI) and place of residence (PR) in RJ state, Brazil.

## Methods

### Study design and research participants

This was a retrospective cross-sectional study including 171 patients diagnosed with ATL according to clinical, epidemiological and laboratory criteria, treated at NIID-FIOCRUZ from 2000 to 2015. Clinical and epidemiological criteria included lesions in exposed areas (mainly ulcers with infiltrated borders or infiltrated plaques), not responsive to local or systemic antibiotic therapy, in patients residing or traveling to places where ATL is endemic. The laboratory diagnosis included parasitological examinations (culture, direct and histopathological examination), ELISA, Montenegro skin test or molecular method (kDNA PCR). Direct examination refers to the search for amastigote forms in glass slides of Imprint (compression of the tissue fragment) or scraping procedures of cutaneous lesions.

Patients with an LLI that was different from their PR in RJ state were eligible for this study. The LLI was defined through a careful medical interview, with questions regarding current and previous places of residence, trips for work or leisure reasons, and possible exposures in endemic areas. Migrant or traveling patients with an undetermined LLI and without identified *Leishmania* species were excluded from the study. Medical records were reviewed to obtain patient data, such as age, sex, profession, clinical form, residence address, LLI, and reason for exposure. Regarding the reason for exposure, the patients were separated according to four categories:

- > Migrants: patients who lived in endemic regions of RJ state, other Brazilian states, or from other countries, who moved to a new residential address in RJ state.
- > Business travelers: patients residing in RJ state who traveled for work reasons to endemic regions, where they acquired the infection.
- > Leisure travelers: patients residing in RJ state who traveled for recreation to endemic regions, where they acquired the infection.
- > Undetermined: patients with more than one reason for exposure.

### Diagnostic and laboratory procedures

In 117 patients, the diagnostic technique used was parasitic isolation in culture, according to protocol registered in <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.22tggen>. Briefly, fragments from a cutaneous or mucosal lesion were cultured in Novy-MacNeal-Nicolle medium plus Schneider's *Drosophila* Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics penicillin and streptomycin. The parasites isolated in culture were cryopreserved in liquid nitrogen (N<sub>2</sub>L).

Growth of promastigote cells was performed in sterile bottles for cell culture until the parasites reached the stationary phase of growth. The total culture volume was centrifuged and the pellet was submitted to three washes in NaCl-EDTA buffer under centrifugation to obtain the parasite mass, which was stored in N<sub>2</sub>L until MLEE could be performed. Samples with reduced growth in culture that did not reach the ideal parasite expansion were submitted to the same washing protocol, and the obtained parasite masses were stored in a freezer at -20°C until DNA extraction to carry out molecular techniques.

In addition to samples with reduced growth in culture, samples that presented variant profiles in one or more enzymatic systems using the MLEE technique were also analyzed by PCR-RFLP, for species confirmation. Sanger sequencing of the ITS1-rDNA was performed only in cases where it was not possible to obtain taxonomic identification by MLEE or PCR-RFLP.

### Etiological identification of *Leishmania* species

**Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE).** Identification of species was determined preferably by MLEE, which is a biochemical characterization technique based on the pH dependent electrophoretic mobility of a predefined set of proteins in a gel. The MLEE was performed on 1% agarose gels supported by GE Healthcare GelBond film (124 x 258 mm), according to previously described procedures [2], using six or seven enzymatic systems: 6PGDH (6-phosphogluconate dehydrogenase, EC 1.1.1.43); GPI (glucose phosphate isomerase, EC 5.3.1.9); NH (nucleotidase, EC 3.2.2.1); G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase, EC 1.1.1.49), PGM (phosphoglucomutase, EC 5.4.2.2); ME (malic enzyme, EC 1.1.1.40) or MDH (malate dehydrogenase, EC 1.1.1.37). The MDH enzymatic system was used only in cases with variant profiles in the other enzymatic systems. Isoenzyme electrophoresis was performed with the reference strain of *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). If any sample presented a profile different to this reference, a new assay was performed with the other reference strains: *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1976/PH8), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), and *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75). Analysis of gel bands was performed qualitatively, by visual comparison of the sample band profiles with the default reference strains.

**Polymerase chain reaction (PCR).** DNA extraction from the parasite masses was performed using a DNAzol Reagent kit (Invitrogen), following the manufacturer's recommendations. PCR assays were performed using the primers 5'GGACGAGATCGAGCGCATGGT3' and 5'TCCCTTCGACGCCCTCCTGGTTG3', to amplify a 234-bp fragment of the gene region encoding hsp70C, as previously described [10]. The amplification products were separated using 2% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and visualized under ultraviolet light.

**Restriction fragment length polymorphism (RFLP).** Amplification products obtained by PCR were digested with two restriction enzymes, *Hae*III (Sigma) and *Bst*UI (Thermo Scientific), following the manufacturer's recommendations. The fragments obtained by enzymatic digestion were separated on a 12.5% polyacrylamide gel and stained with silver, and bands were compared with a DNA fragment size marker (100-bp DNA ladder). The banding pattern was compared with the reference strains: *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1976/PH8), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426), and *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533).

**Sequencing.** The ITS1-rDNA was amplified by conventional PCR using the primers L5.8S: 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3' and LITSR: 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' [14]. Amplification reactions were performed in volumes of 50 µL. Amplicons from the PCR-positive samples (300–350 bp, depending on the species) were visualized on a 2% agarose gel and purified using the Wizard SV Gel kit and PCR Clean-up System kit (Promega, Madison, USA). The products were then sequenced with the same primers used in the PCR assay. Sequencing was performed on an automated sequencer at Plataforma de Sequenciamento Genômico ABI-3730 (Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ).

Sequence alignment was performed using SeqMan Pro (DNASTAR) and comparisons were conducted with *Leishmania* reference strains sequences obtained from the GenBank database. Phylogenetics analyses with the evolutionary history was inferred using the maximum likelihood method based on the Jukes–Cantor model, and the sequences were aligned using Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) version 6. This same software was used to calculate a distance matrix and the genetic distance percentage between the test samples and reference strains of *Leishmania* spp.

### Geospatial analysis

Georeferencing of each residence address and its respective LLI was performed using the online cartographic platform Google Earth, OpenStreetMap, or Bing Maps [30], with the geodetic reference system WGS 84 (World Geodetic System 1984). For LLI, georeferencing was performed from the centroid of the municipality, state, or country. Georeferencing was not possible in cases with two or more LLI, which were classified as undetermined LLI.

The maps were developed to represent the spatial distribution of *Leishmania* species according to the residence address of patients, in RJ state and RJ municipality. In the analysis of flows, maps were generated with the direction of the flows from the place of origin (LLI) to the destination (PR), also indicating the density (number of cases) and *Leishmania* species. The maps were constructed using ArcGIS 9.1 (Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA, USA), using cartographic bases of the world, Brazil, RJ state, and RJ municipality obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE).

### Statistical analysis

Data entry was carried out through Microsoft Excel software and analyzed using SPSS software version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The frequencies (%) of categorical variables (sex, clinical form, country of infection, Brazilian region of infection, *Leishmania* species identified, and reason for exposure) were described, as well as the median (minimum–maximum) of the continuous variable age, as this was determined to be nonparametric using the Shapiro–Wilk normality test. Pearson’s chi-squared or Fisher’s exact test were used to verify the association between categorical variables. The Mann–Whitney U test was used to compare the median of age according to reason for exposure. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

### Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee of NIID-FIOCRUZ (license number 1.591.506), all medical data analyzed were anonymized and all patients signed an informed consent form.

### Results

Of the 900 patients diagnosed with ATL at NIID-FIOCRUZ from 2000 to 2015, 195 (21.7%) patients with permanent or temporary residence in RJ state reported the LLI as other countries, other Brazilian states, or other regions of RJ state but different to their residence address. Of these patients, 24 were excluded because they had undetermined LLI and no *Leishmania* species identified. The final sample included 171 patients: 81 migrants (47.4%), 48 business travelers (28.1%), 33 leisure travelers (19.3%) and 9 undetermined (5.2%).

Among patients who were business travelers, the professions reported were military personnel (*n* = 30, 62.5%), electrician, oil or geology technician (*n* = 3, 6.2%), agronomist or forestry engineer (*n* = 2, 4.2%), and other professions with one patient each (*n* = 13, 27.1%). Clinical epidemiological data from the three groups of patients with determinate LLI are shown in [Table 1](#).

Of the 171 patients, 117 (68.4%) were diagnosed via isolation of *Leishmania* spp. in culture. The diagnosis was confirmed in the remaining patients using at least one of the following criteria: visualization of amastigotes forms of *Leishmania* on histopathological examination or direct examination, demonstration of parasitic kDNA by PCR, clinical epidemiological criteria associated with serological test positivity (ELISA) or Montenegro skin test.

**Table 1. Sociodemographic and clinical characteristics of 162 patients\* diagnosed with American tegumentary leishmaniasis at NIID-FIOCRUZ from 2000 to 2015.**

	Migrants n = 81 (50%)	Business Travelers n = 48 (29.6%)	Leisure Travelers n = 33 (20.4%)	TOTAL n = 162* (100%)
<b>Sex<sup>a1, a2</sup></b>				
Female	22 (27.16%)	5 (10.42%)	14 (42.42%)	41 (25.31%)
Male	59 (72.84%)	43 (89.58%)	19 (57.58%)	121 (74.69%)
<b>Total</b>	<b>81 (100.00%)</b>	<b>48 (100.00%)</b>	<b>33 (100.00%)</b>	<b>162 (100.00%)</b>
<b>Age<sup>b1, b2</sup></b>				
Median (minimum–maximum)	44 (min 4–max 83)	30 (min 20 –max 56)	29 (min 12 –max 75)	-
<b>Region of Origin</b>				
<b>Brazil</b>				
North <sup>c1, c2</sup>	5 (6.17%)	33 (68.75%)	4 (12.12%)	42 (25.93%)
Northeast <sup>d1, d2, d3</sup>	40 (49.38%)	2 (4.17%)	7 (21.21%)	49 (30.25%)
South	-	-	1 (3.03%)	1 (0.62%)
Southeast <sup>e1, e2</sup>	31 (38.27%)	4 (8.33%)	17 (51.52%)	52 (32.10%)
Midwest	1 (1.23%)	3 (6.25%)	2 (6.06%)	6 (3.70%)
Indeterminate	1 (1.23%)	4 (8.33%)	1 (3.03%)	6 (3.70%)
<b>Other countries</b>				
Bolivia	1 (1.23%)	1 (2.08%)	-	2 (1.23%)
Ecuador	-	1 (2.08%)	-	1 (0.62%)
French Guiana	2 (2.47%)	-	-	2 (1.23%)
Israel	-	-	1 (3.03%)	1 (0.62%)
<b>Total</b>	<b>81 (100.00%)</b>	<b>48 (100.00%)</b>	<b>33 (100.00%)</b>	<b>162 (100.00%)</b>
<b>Clinical forms<sup>f1, f2</sup></b>				
Cutaneous	43 (53.09%)	45 (93.75%)	26 (78.79%)	114 (70.37%)
Mucosal and Mucocutaneous**	38 (46.91%)	3 (6.25%)	7 (21.21%)	48 (29.63%)
<b>Total</b>	<b>81 (100.00%)</b>	<b>48 (100.00%)</b>	<b>33 (100.00%)</b>	<b>162 (100.00%)</b>

\* The 162 patients were residents in Rio de Janeiro state and with a determined likely location of infection. Nine patients with more than one reason for exposure classified as undetermined, were removed from this analysis.

\*\* For statistical calculation, cases of mucocutaneous leishmaniasis were included in the mucosal leishmaniasis group. p < 0.05 values are considered significant.

<sup>a1</sup> p = 0.024: Migrant x Business Travelers

<sup>a2</sup> p = 0.001: Business Travelers x Leisure Travelers

<sup>b1</sup> p < 0.001: Migrant x Business Travelers

<sup>b2</sup> p = 0.028: Migrant x Leisure Travelers

<sup>c1</sup> p < 0.001: Migrant x Business Travelers

<sup>c2</sup> p < 0.001: Business Travelers x Leisure Travelers

<sup>d1</sup> p < 0.001: Migrant x Business Travelers

<sup>d2</sup> p = 0.028: Business Travelers x Leisure Travelers

<sup>d3</sup> p = 0.005: Migrant x Leisure Travelers

<sup>e1</sup> p < 0.001: Migrant x Business Travelers

<sup>e2</sup> p < 0.001: Business Travelers x Leisure Travelers

<sup>f1</sup> p < 0.001: Migrant x Business Travelers

<sup>f2</sup> p < 0.011: Migrant x Leisure Travelers

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.t001>

### Leishmania species typing

It was not possible to recover any parasites from 13 samples due to contamination by bacteria or fungi or no growth in culture after cryopreservation. Of the 117 parasites isolated in culture, 104 (88.9%) were characterized as belonging to one of four different *Leishmania* species and

Table 2. Identification of 104 *Leishmania* species regarding the reason for exposure.

Species Typing	Migrants	Business Travelers	Leisure Travelers	Undetermined reason for exposure	TOTAL
<i>L. (V.) braziliensis</i>	40	22	13	9	84 (80.8%)
<i>L. (V.) braziliensis</i> (variant)	-	4	-	-	4 (3.8%)
<i>L. (V.) naiffi</i>	-	8	-	-	8 (7.7%)
<i>L. (V.) guyanensis</i>	3	3	1	-	7 (6.7%)
<i>L. (L.) amazonensis</i>	1	-	-	-	1 (1%)
<b>TOTAL</b>	<b>44 (42.3%)</b>	<b>37 (35.6%)</b>	<b>14 (13.5%)</b>	<b>9 (8.6%)</b>	<b>n = 104 (100%)</b>

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.t002>

one genetic variant (Tables 2 and 3). Eleven (29.7%) of the business travelers were infected by species other than *L. (V.) braziliensis* or its variant, compared with four (9.1%) of the migrants ( $p = 0.017$ ).

### Genetic variants of *L. (V.) braziliensis*

In the analysis of seven enzymatic loci using the MLEE technique, the four samples (P1, P2, P3 and P4) showed a profile of *L. (V.) braziliensis* in two, three, four, or five enzymatic loci and variant profiles in the other loci (Supplementary data—S1 Table).

The isolate P4, with an LLI in Acre state, presented a profile of *L. (V.) braziliensis* in two loci and a variant profile in five enzymatic loci. According to PCR-RFLP analysis, P4 presented an *L. (V.) braziliensis* / *L. (V.) naiffi* profile after digestion with *Hae*III enzyme and a *L. (V.) shawi* profile after digestion with *Bst*UI enzyme. To confirm the species, genetic sequencing of the ITS1-rDNA was performed and the consensus sequence is shown as supplementary data—S1 Consensus Sequence. Phylogenetic analyses (Fig 1) and genetic distance percentage between the P4 isolate and other *Leishmania* species (Table 4) confirmed the P4 isolate to be a genetic variant of *L. (V.) braziliensis*.

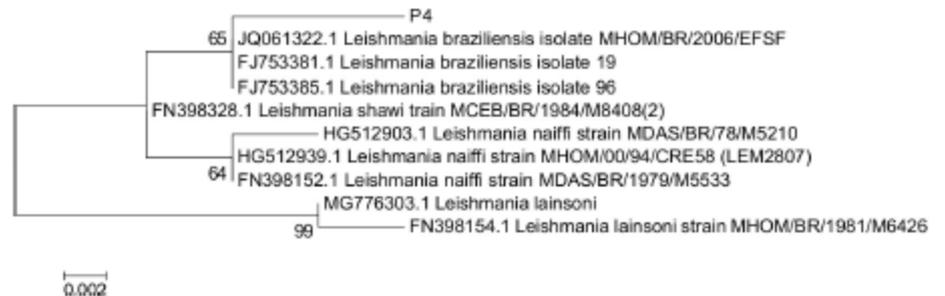
Of the 104 *Leishmania* species identified, 101 were from Brazil and 3 from other countries. In the South, Southeast and Midwest Regions 100% of the species identified were *L. (V.) braziliensis*. All the four *L. (V.) braziliensis* (variants) identified were from the North Region. In the North region, of the 26 *Leishmania* species identified, 11 (42.3%) were different from *L. (V.) braziliensis* and in the Northeast region, of the 26 *Leishmania* species identified, 3 (11.5%) were different of *L. (V.) braziliensis* ( $p = 0.012$ ) (Tables 2 and Supplementary data—S2 Table). The predominant clinical form was CL ( $n = 80$ ; 77%), followed by ML ( $n = 17$ , 16.3%) and MCL ( $n = 7$ ; 6.7%) (Supplementary data—S2 Table).

Table 3. Identification techniques used for typing of 104 *Leishmania* species isolated from travelers and migrants who were patients attended at NIID-FIOCRUZ from 2000 to 2015.

	A Isoenzymes (MLEE)	B PCR-RFLP	A and B	A and B and Sequencing	TOTAL	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	68	16	-	-	84 (80.8%)	88 (84.6%)
<i>L. (V.) braziliensis</i> (variant)	1	-	2	1	4 (3.8%)	
<i>L. (V.) naiffi</i>	1	3	4	-	8 (7.7%)	
<i>L. (V.) guyanensis</i>	6	1	-	-	7 (6.7%)	
<i>L. (L.) amazonensis</i>	1	-	-	-	1 (1%)	
<b>TOTAL</b>	<b>77 (74%)</b>	<b>20 (19.2%)</b>	<b>6 (5.8%)</b>	<b>1 (1%)</b>	<b>104 (100%)</b>	

NIID = Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases; MLEE = Multilocus enzyme electrophoresis

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.t003>



**Fig 1. Phylogenetic analysis demonstrating *Leishmania (Vannia)* species with sequences of ITS1-rDNA.** The variant *Leishmania braziliensis* P4 sequence (GenBank accession number MN508061) is present, with 0.8% of genetic distance when compared to other sequences of *Leishmania braziliensis*. The evolutionary history was inferred using maximum likelihood based on the Jukes-Cantor model; sequences were aligned using MEGA version 6 software. Outgroup: *Leishmania lainsoni*. Bootstrap test (1000 replications) are shown next to the branches, and GenBank accession numbers are in front of the species names.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.g001>

### Distribution of *Leishmania* species according to place of residence (PR)

We determined the geographic distribution of 104 *Leishmania* species identified, according to the residence address of patients (Fig 2).

The largest number of species identified (n = 66) and the highest diversity was in the municipality of RJ: *L. (V.) braziliensis* (n = 49), *L. (V.) braziliensis* variant (n = 3), *L. (V.) naiffi* (n = 7), *L. (V.) guyanensis* (n = 6), and *L. (L.) amazonensis* (n = 1) (Fig 3).

In the other municipalities of RJ state, 38 species were identified: *L. (V.) braziliensis* (n = 35), *L. (V.) braziliensis* variant (n = 1), *L. (V.) naiffi* (n = 1), and *L. (V.) guyanensis* (n = 1). In Niteroi municipality, *L. (V.) braziliensis* (n = 2) and *L. (V.) braziliensis* (variant) (n = 1) were detected. In Nova Iguaçu municipality, *L. (V.) braziliensis* (n = 3) and *L. (V.) naiffi* (n = 1) were identified. *L. (V.) braziliensis* (n = 2) and *L. (V.) guyanensis* (n = 1) were detected in Seropédica municipality. In the other 23 municipalities, *L. (V.) braziliensis* as a single species was identified (Figs 2 and 4).

### Flow maps

The flow map of RJ state (n = 30), considering the municipality of residence in RJ state and its respective likely location of infection within RJ state is shown in Fig 5.

Fig 6 illustrates the flow map, including Brazilian states (n = 112) and countries (n = 6) with *Leishmania* species aggregated according to LLI and density of cases. Uncharacterized species were identified as *Leishmania* spp. Of the six cases from other countries, three were identified:

**Table 4. Genetic distance percentage between P4 isolate and other *Leishmania* species in ITS1-rDNA sequences obtained from GenBank.**

<i>Leishmania</i> species (GenBank code)	Genetic Distances (%) for P4 isolate *
<i>L. braziliensis</i> (JQ061322/FJ753385/FJ7533/81)	0.8%
<i>L. shawi</i> (FN398328)	1.2%
<i>L. naiffi</i> (HG512939/FN398152)	1.6%
<i>L. naiffi</i> (HG512903)	2.1%
<i>L. lainsoni</i> (MG776303)	3.3%
<i>L. lainsoni</i> (FN398154)	3.8%

\* GeneBank code MN508061

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.t004>

Table 5. Species of *Leishmania* identified according to likely location of infection in Brazilian regions or other countries.

	Brazil						Other Countries	TOTAL
	North Region	Northeast Region	Southeast Region	Midwest Region	South Region	Indeterminate Region		
<i>L. (V.) braziliensis</i>	11	23	39	2	1	6	2	84 (80.8%)
<i>L. (V.) braziliensis</i> (variant)	4	-	-	-	-	-	-	4 (3.8%)
<i>L. (V.) naiffi</i>	7	-	-	-	-	1	-	8 (7.7%)
<i>L. (V.) guyanensis</i>	4	2	-	-	-	-	1	7 (6.7%)
<i>L. (L.) amazonensis</i>	-	1	-	-	-	-	-	1 (1%)
TOTAL	26 (25%)	26 (25%)	39 (37.5%)	2 (1.9%)	1 (1%)	7 (6.7%)	3 (2.9%)	n = 104 (100%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.t005>

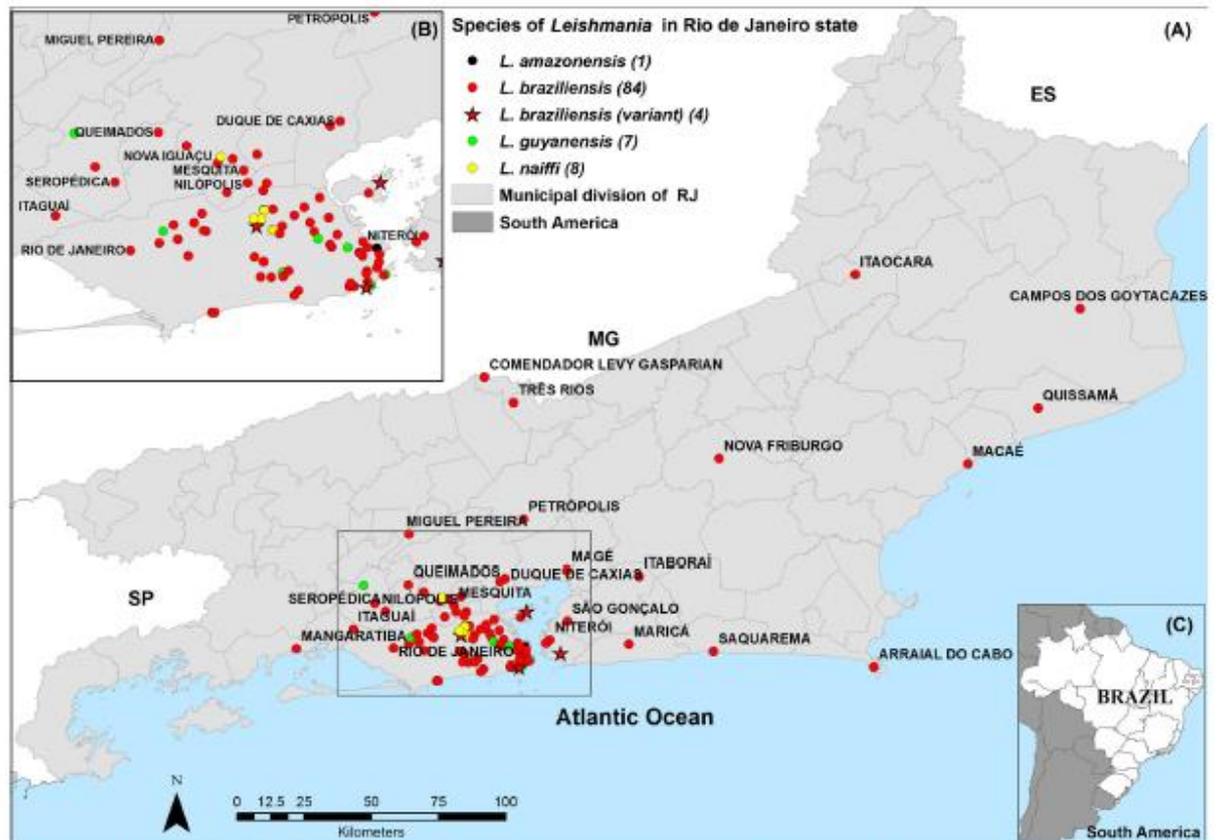
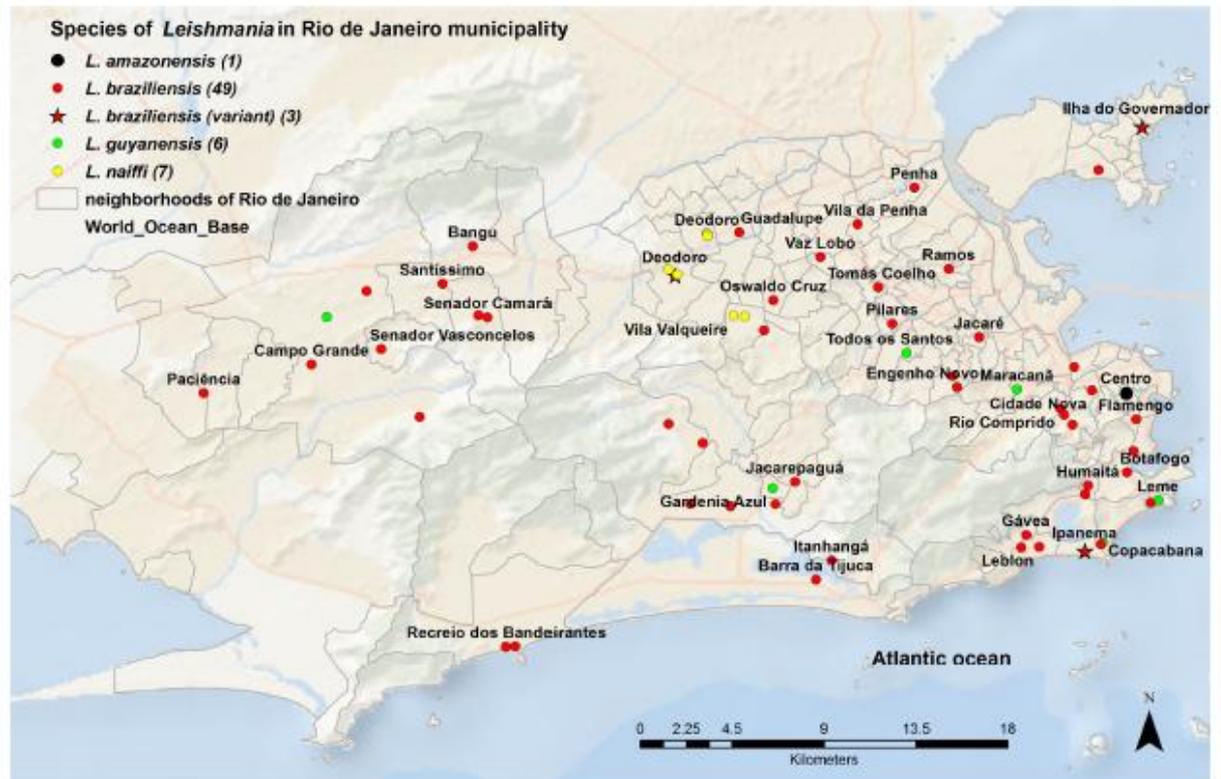


Fig 2. Species of *Leishmania* in Rio de Janeiro (RJ) state. The 104 typed species of *Leishmania* were plotted on the map by municipalities of RJ state (A); The municipality of Rio de Janeiro and some neighboring municipalities are highlighted to facilitate the visualization of the identified *Leishmania* species (B); Location of RJ state on maps of Brazil and South America (C). SP = São Paulo state; MG = Minas Gerais state; ES = Espírito Santo state. This map was created using ArcGIS 9.1 software and cartographic bases obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (<https://ibge.gov.br/>).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.g002>



**Fig 3. Species of *Leishmania* in Rio de Janeiro (RJ) municipality.** The 66 species of *Leishmania* identified were plotted on the map by neighborhoods of RJ municipality, according to the residence address of the patients in RJ municipality. This map was created using ArcGIS 9.1 software and cartographic bases obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (<http://ibge.gov.br>).

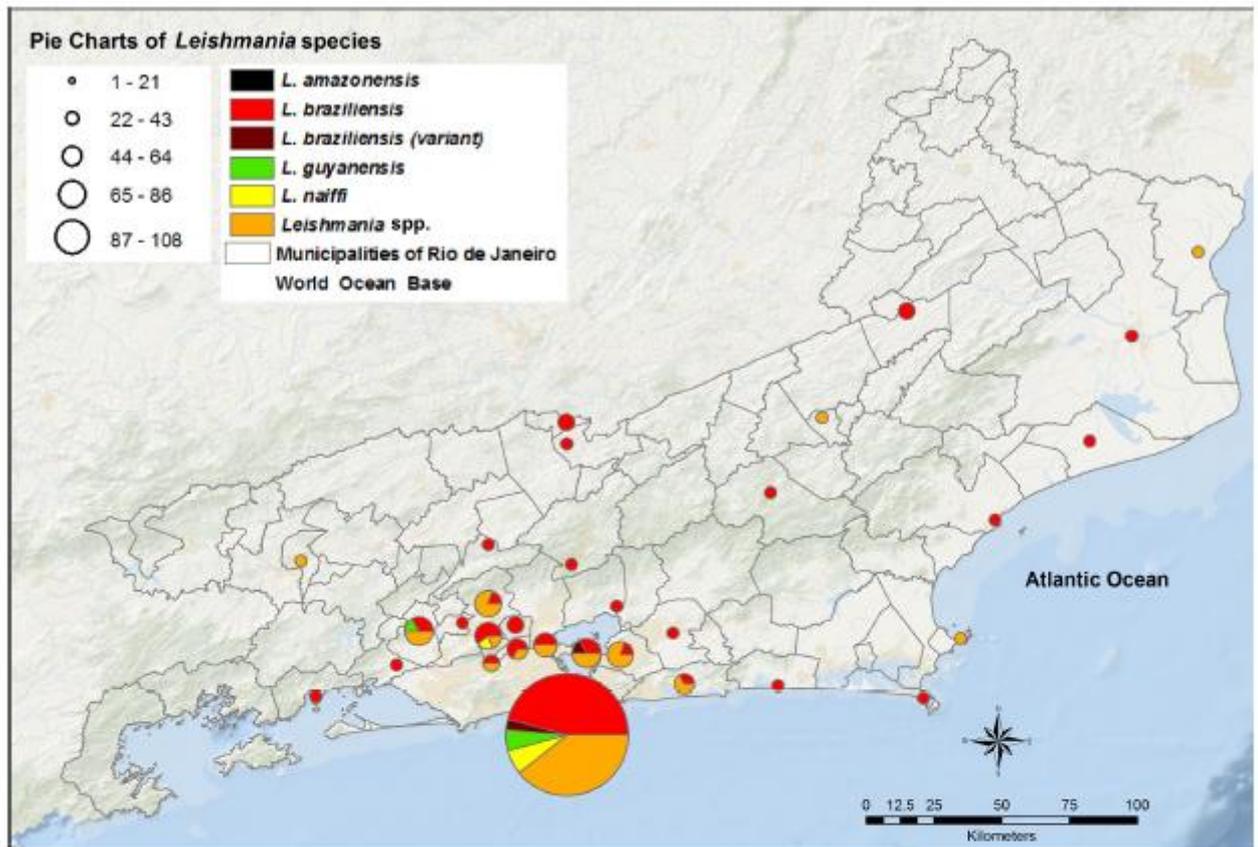
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.g003>

*L. (V.) guyanensis* from French Guiana, *L. (V.) braziliensis* from Bolivia, and *L. (V.) braziliensis* from Ecuador. It was not possible to identify the other three species from Bolivia, French Guiana, and Israel as they had negative ( $n = 1$ ) or no culture results ( $n = 2$ ).

The highest densities were among patients with LLI in the following states: Amazonas ( $n = 32$ ), Bahia ( $n = 18$ ), Ceará ( $n = 15$ ), Minas Gerais ( $n = 8$ ), and Maranhão ( $n = 8$ ). The most diverse flows of *Leishmania* species came from the Amazonas state with the following species: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) braziliensis* variant, *L. (V.) naiffi*, and *L. (V.) guyanensis*, as well as from the Maranhão state: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, and *L. (L.) amazonensis* (Fig 6).

## Discussion

Among the countries of South America, Brazil is the country that receives the highest number of international tourists. RJ state receives millions of domestic and international tourists annually, as it is the main leisure destination in Brazil [31]. Ecotourism, with outdoor adventure and leisure activities that take place in endemic areas, increases the risk of contracting ATL, which is among the 10 most common dermatological diseases occurring among tourists returning from tropical countries [32]. In this study, ATL cases were detected among both



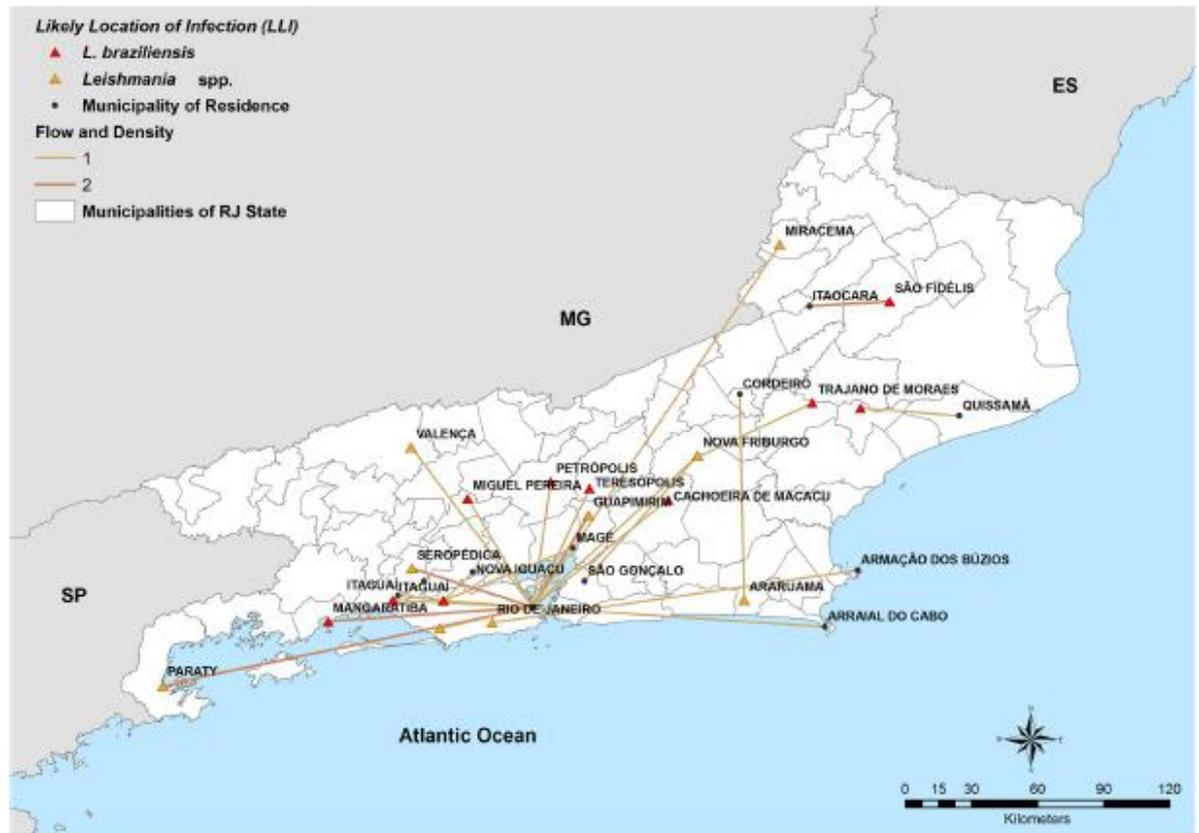
**Fig 4. Pie charts of *Leishmania* species, representing the aggregated distribution of *Leishmania* species by municipalities of Rio de Janeiro state. The size of pie chart is proportional to the amount of samples of *Leishmania* in each municipality. Uncharacterized species were represented by an orange color (*Leishmania* spp.). This map was created using ArcGIS 9.1 software and cartographic bases obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (<https://ibge.gov.br/>).**

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.g004>

leisure travelers and professionals traveling to work in endemic regions, such as biologists, forest engineers, police officers, technicians, and military personnel. Among these professionals, the highest number of cases was detected among military personnel who reported training in the Amazonian forest. These data reinforce the emergence of leishmaniasis among travelers and the importance of diagnostic, prevention, and control measures for professionals and tourists traveling to endemic regions [27,28]. In addition to business and leisure travelers, migrants also facilitate the flow of different *Leishmania* species to RJ state.

It is important highlight that the samples analyzed represent the casuistry of a reference center, responsible for the care and diagnosis of 25% of the ATL cases reported in RJ state, including about 75% of the more serious cases. It was also not possible to identify the *Leishmania* species of some patients because they had no parasitic isolation in culture or had their samples lost. Furthermore, other limitations of the study were some patients reported two or more LLI or reason for exposure, both being classified as undetermined.

Analysis of the reasons for exposure showed significant differences in relation to the regions of origin. The reasons for exposure among patients in the North Region were more frequently



**Fig 5. Flow map with density of cases in Rio de Janeiro state.** Municipalities of residence are represented by circles and likely location of infection by triangles. Unidentified species (*Leishmania* spp.) are represented by an orange triangle and species identified as *L. (V.) braziliensis* by a red triangle. Yellow lines represent the migratory flow of one case (density 1) and brown lines represent the migratory flow of two cases (density 2). This map was created using ArcGIS 9.1 software and cartographic bases obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (<https://ibge.gov.br>).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.g005>

associated with business travel, and those in the Northeast Region were associated with migration; in the Southeast Region, exposure was more associated with leisure travel, although this region also had a large number of migrants.

In this study, there was a greater number of ATL cases among young adults and men. Regarding sex, there were more cases among men than women, both in migrants and travelers. However, this sex difference was smaller among leisure travelers. Among working travelers, there was a higher number of cases of ATL among men. There was a significant difference with respect to age between migrants and travelers. The median age was higher among migrants than among business and leisure travelers, demonstrating that travelers in the study area are younger. The predominant clinical form found was CL; ML and MCL were more common among migrants than business and leisure travelers. Although our study population consisted of migrants and travelers, these data are in agreement with reported cases in RJ between 2007 and 2017, with a greater number of ATL cases in adults, men, and those with CL as the main clinical form [33]. However, although CL was the predominant form, the number

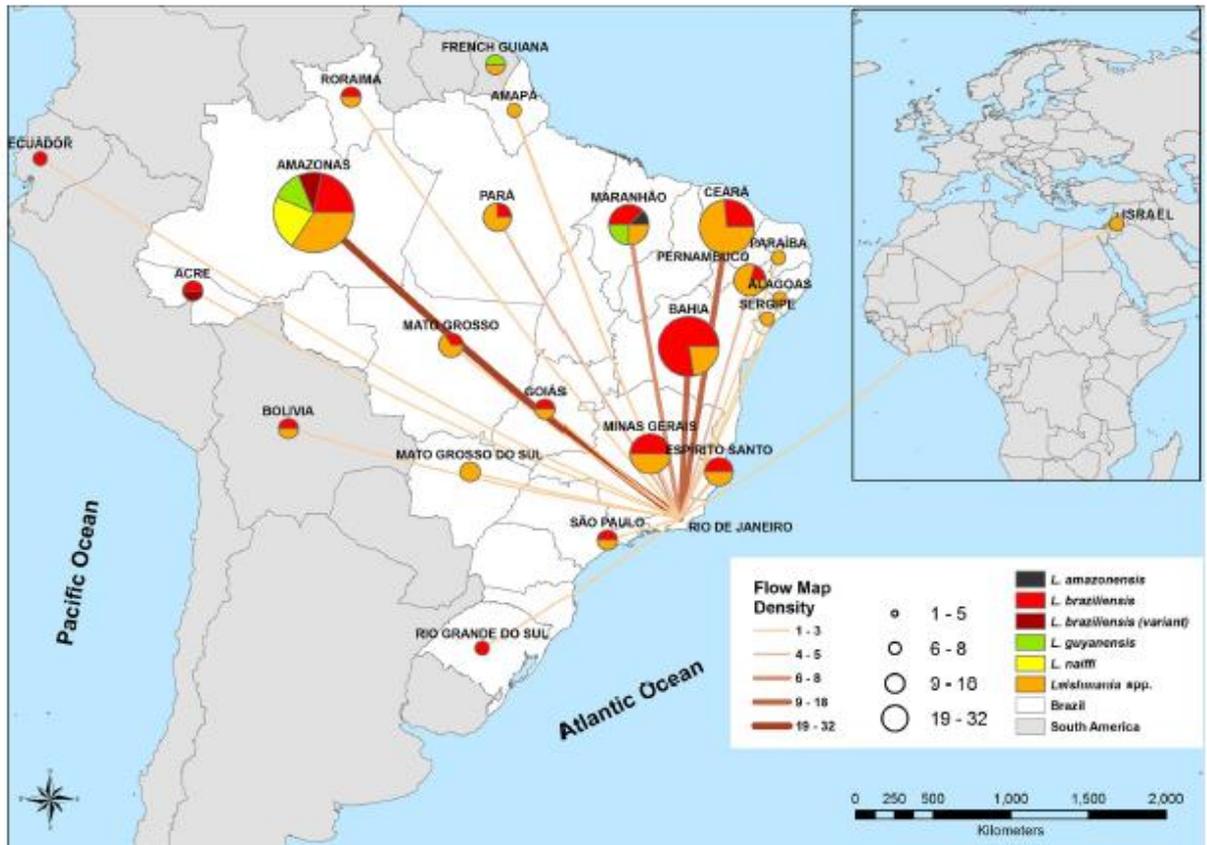


Fig 6. Map of flows to Rio de Janeiro state, with density of cases from other countries and Brazilian states. The density of cases was divided into five categories, differentiated by color and thickness. The lines are varied in width to represent the number of cases, with a broader line indicating greater flow. The width of the line is proportional to the flow. Pie charts represent the aggregated distribution of *Leishmania* species by country and state. This map was created using ArcGIS 9.1 software and cartographic bases obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (<https://ibge.gov.br/>).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007748.g006>

of ML and MCL cases was higher than that reported in RJ state and in Brazil. This can be explained by the fact that this study was carried out at a reference center, with greater availability of specific tests and doctors specialized in otolaryngology and dermatology, thus enhancing the ability to diagnose ML and MCL [29].

The main diagnostic technique was parasite isolation in culture of cutaneous or mucosal lesion fragments. Despite the limitations already described, use of MLEE allowed us to identify most species, corroborating what has been described in the literature in which this technique remains the gold standard for typing parasites of the *Leishmania* genus [2]. However, in cases where etiological identification with MLEE was not possible, a PCR-RFLP assay for the heat-shock protein 70 gene (*hsp70C*) proved to be a good alternative for discrimination of *Leishmania* species, as described in other studies [11,34]. In only one case, it was necessary to use DNA Sanger sequencing and the target used (ITS1-rDNA) proved effective for etiological identification. Another advantage is that this technique can be applied directly to clinical samples, without the need of parasitic isolation in culture [13,14].

In the New World, parasites of the subgenus *Viannia*, the main agents of ATL, represent a group of microorganisms with considerable intraspecific variability, which may hamper taxonomic classification and epidemiological studies [35,36]. The main species identified in this study was *L. (V.) braziliensis*, corroborating that this is the most frequent species in Brazil [2]. In the North and Northeast regions of Brazil, other species have also been identified, such as *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, and genetic variants of *L. (V.) braziliensis*. The only species from the South, Southeast, and Midwest regions was *L. (V.) braziliensis*, with no variants or other species identified. It is important to emphasize that some species of sandfly vectors of the *Leishmania* species identified in this study have already been described in RJ state: *Lu. (N.) flaviscutellata*, vector of *L. (L.) amazonensis*, *Lu. (P.) paraensis* and *Lu. (P.) ayrozai*, vectors of *L. (V.) naiffi*. There is no report in the literature about the presence of vectors of *L. (V.) guyanensis* in RJ state [5].

The Brazilian states with the highest density of ATL cases were Amazonas, Ceará, and Bahia. However, states that presented the greatest diversity of species were Amazonas and Maranhão; the latter state is located in the Northeast Region of Brazil. *Leishmania (L.) amazonensis* was identified in a single case isolated from a migrant patient from Maranhão, who had CL.

In the present study, 35 species from Amazon region were identified and *L. (V.) braziliensis* was the most frequent. Four cases identified as genetic variants of *L. (V.) braziliensis* were from this region, three from Amazonas state and one from Acre state, both located in the Amazon forest biome. It was only possible to confirm the etiological identity of the sample from Acre using sequencing, as this isolate showed great variability in both the isoenzyme profiles and using PCR-RFLP. From an epidemiological point of view, the complex cycle of transmission in which individuals are exposed, basically in the Amazonian area, contributes to the genetic diversity of *Leishmania* parasites [37,38]. Eco-epidemiological interactions occurring in such endemic areas may be reflected in the dynamics of circulating populations of *L. (V.) braziliensis*, and finding genetic variants of this species may be a consequence. It is well known that heterogeneous subpopulations circulate among humans and vectors as well as domestic and sylvatic animals in simple and complex epidemiological situations [39]. In addition, the polydonality of the initial inoculum has been previously reported [35] and genetic variability of *L. (V.) braziliensis* has also been identified among patients and among different lesions in the same patient [40]. Reinforcing these arguments, other authors have also demonstrated an association between the diversity of vectors involved in the transmission of *L. (V.) braziliensis* and the genetic diversity of these parasites [41]. In order to complement the data of this study, future studies with more discriminatory methods like Multilocus Sequence Typing (MLST), Multilocus Microsatellite Typing (MLMT) and Restriction-site associated DNA sequencing (RAD-seq) could be performed to evaluate the intra and inter-specific genetic diversity of these isolates of *Leishmania* spp [42,43].

In the Amazon region, there are at least seven circulating species of dermatotropic *Leishmania*, with *L. (V.) guyanensis* being the most frequent species in this region [44]. However, in this study, 35 species from the Amazon region were identified and *L. (V.) braziliensis* was the most prevalent. *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) naiffi* were found in the same number of cases. Our results are in agreement with those of previous studies, which suggest that *L. (V.) naiffi* may be more frequent in the Amazon region than is currently recognized [45,46]. Another case of infection by *L. (V.) naiffi* was identified, but the patient had an undetermined LLI as he reported a trip to the Amazon and also to the Pantanal biome, in Mato Grosso state. It is important to mention that all identified cases of *L. (V.) naiffi* were among military personnel who were training in the Amazonian forest.

Two cases from French Guiana were identified, one as a case of CL in which the species could not be identified, and the other as a case of MCL caused by *L. (V.) guyanensis*, the most frequent species in that country [47].

Two cases were from Bolivia; one was a case of ML in Santa Cruz de la Sierra, the largest and most populous city in the country, and the species was identified as *L. (V.) braziliensis*, the most frequent species in that country [48]. The other case was CL, in which the species could not be identified.

There was one case of CL from Ecuador, in which the species was identified as *L. (V.) braziliensis*. This species is well distributed throughout the Ecuadorian Amazon region and has also been observed on the Pacific Coast. Currently, eight dermatotropic species of *Leishmania* are described in Ecuador: *Leishmania (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major-like*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, and *L. (V.) guyanensis*, the latter of which is the most frequent species in that country [49].

There was also one case from Israel, with no parasitic isolation in culture; therefore, no species of *Leishmania* could be identified. Leishmaniasis is endemic in Israel and is increasing in frequency. The pathogens that cause CL in Israel are *Leishmania major* and *Leishmania tropica* [50].

The diversity of clinical manifestations of ATL is related to the diversity of *Leishmania* species and also to the host immune response. Thus, clinical and therapeutic management may be different depending on the species of *Leishmania* involved. The treatment with meglumine antimoniate has already been shown to be effective in patients from different Brazilian regions, except in areas where *L. (V.) guyanensis* infections are common, which has poor response to antimonials and should be initially treated with pentamidine [51,52].

The transmission dynamics of ATL in the state of RJ has been variable, with a decreasing trend in the number of cases reported in recent years [33]. For a better understanding of the epidemiology of leishmaniasis, it is important to know the circulating *Leishmania* species in a determined geographical area. This work is the first contribution to the knowledge of the routes of *Leishmania* species introduced in RJ state by migrants and travelers patients. In addition to *L. (V.) braziliensis*, which was the most common species, other species have also been identified, such as *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (L.) amazonensis*, and genetic variants of *L. (V.) braziliensis*. It is important to emphasize that ATL is a vector-borne disease and only the presence of these migrants and travelers patients in RJ state does not guarantee the autochthonous transmission, being necessary the adaptation of these different species of *Leishmania* to environmental conditions as well as the presence of reservoirs and phlebotomine vectors in this region. The question remains whether the establishment and autochthonous transmission of these imported species is possible. This can only be answered using knowledge of the geographic distribution of these *Leishmania* species as a basis for future studies on typing of *Leishmania* species isolated from patients diagnosed in the state of RJ, and associations of the presence of these species with the distribution of hosts, vectors, climatic data, vegetation, and socioenvironmental conditions. Such research will contribute with important elements needed for the surveillance and control of leishmaniasis in RJ state.

List of accession numbers/ID numbers for genes and proteins mentioned in the text:  
 Name/Gene ID LMJF\_28\_2780: heat-shock protein (*hsp*)70 gene on chromosome 28 of *Leishmania major* [strain Friedlin NC\_007269.2 (1060574.1062550, complement) accession FR796424 CT005266] Font: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, ID number EC 1.1.1.43: 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH); ID number EC 5.3.1.9: glucose phosphate isomerase (GPI); ID number EC 3.2.2.1: nucleotidase (NH); ID number EC 1.1.1.49: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); ID number EC 5.4.2.2: phosphoglucomutase (PGM);

ID number EC 1.1.1.40: malic enzyme (ME) and ID number EC 1.1.1.37 malate dehydrogenase (MDH). Font: <https://www.genome.jp/kegg/>

## Supporting information

**S1 Checklist. STROBE statement-checklist.**

(DOC)

**S1 Table. Enzymatic\_Variants\_loci\_L\_braziliensis.**

(DOCX)

**S2 Table. Likely\_Location\_of\_Infection\_Species\_typing\_and\_associated\_clinical\_forms.**

(DOCX)

**S1 Consensus. Sequence\_ITS-1\_P4.**

(DOCX)

## Acknowledgments

The authors are grateful to Elizabeth Cristina Araújo Ferreira da Silva (CNPq scholarship) for help with the recovery of cryopreserved samples and preparation of the parasitic masses. We are also thankful to the Military Institute of Engineering (IME) for providing the ARCGIS 9.1 software license.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Luciana de Freitas Campos Miranda, Maria de Fátima Madeira, Armando de Oliveira Schubach.

**Data curation:** Luciana de Freitas Campos Miranda, Maria Inês Fernandes Pimentel, Mariza de Matos Salgueiro.

**Formal analysis:** Claudia Maria Valette-Rosalino, Samanta Cristina das Chagas Xavier.

**Funding acquisition:** Maria de Fátima Madeira, Armando de Oliveira Schubach.

**Investigation:** Luciana de Freitas Campos Miranda, Aline Fagundes da Silva, Cíntia Xavier de Mello, Juliana Helena da Silva Barros, Claudia Maria Valette-Rosalino, Samanta Cristina das Chagas Xavier.

**Methodology:** Luciana de Freitas Campos Miranda, Aline Fagundes da Silva, Cíntia Xavier de Mello, Juliana Helena da Silva Barros, Claudia Maria Valette-Rosalino, Samanta Cristina das Chagas Xavier.

**Project administration:** Raquel da Silva Pacheco, Maria de Fátima Madeira, Armando de Oliveira Schubach.

**Resources:** Luciana de Freitas Campos Miranda, Maria Inês Fernandes Pimentel, Mariza de Matos Salgueiro, Cíntia Xavier de Mello, Juliana Helena da Silva Barros, Samanta Cristina das Chagas Xavier.

**Supervision:** Armando de Oliveira Schubach.

**Validation:** Luciana de Freitas Campos Miranda, Raquel da Silva Pacheco.

**Visualization:** Luciana de Freitas Campos Miranda.

**Writing – original draft:** Luciana de Freitas Campos Miranda, Raquel da Silva Pacheco, Armando de Oliveira Schubach.

**Writing – review & editing:** Luciana de Freitas Campos Miranda, Raquel da Silva Pacheco, Maria Inês Fernandes Pimentel, Mariza de Matos Salgueiro, Aline Fagundes da Silva, Cíntia Xavier de Mello, Juliana Helena da Silva Barros, Claudia Maria Valette-Rosalino, Maria de Fátima Madeira, Samanta Cristina das Chagas Xavier, Armando de Oliveira Schubach.

## References

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance [Internet]. Geneva: WHO; 2017. 557–572p. (92; vol. 38). Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/who\\_war9238/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_war9238/en/)
2. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]. Brasília-DF: Ministério da Saúde; 2017. 189 p.
3. Akhouni M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *Baños A-L*, organizador. *PLoS Negl Trop Dis*. 3 de março de 2016; 10(3):e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349> PMID: 26937644
4. Shmabukuro PHF, de Andrade AJ, Galati EAB. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys*. 8 de março de 2017;(660):67–106. <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508> PMID: 28794674
5. Carvalho BM, Dias CMG, Rangel EF. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Rio de Janeiro State, Brazil: species distribution and potential vectors of leishmaniasis. *Rev Bras Entomol*. 2014; 58(1):77–87.
6. Marzochi MC de A, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pública*. 1994; 10(suppl 2):S359–75.
7. Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 50(3):296–311. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.296> PMID: 8147488
8. Van der Auwera G, Dujardin J-C. Species Typing in Dermal Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28(2):265–94. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14> PMID: 25672782
9. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol*. 1º de março de 2010; 10(2):238–45. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007> PMID: 19913110
10. Graça GC da, Volpini AC, Romero GAS, Oliveira Neto MP de, Hueb M, Porrozzis R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(5):664–74. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000500014> PMID: 22850958
11. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for Leishmania species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*. 2010; 137(08):1159–68.
12. Cupolillo E, Grimaldi Júnior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania. *Mol Biochem Parasitol*. 1995; 73(1–2):145–55. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00108-d](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00108-d) PMID: 8577322
13. Dávila AM, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within Leishmania. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000; 94(6):651–4. <https://doi.org/10.1080/00034980050152085> PMID: 11064767
14. el Tai NO, Osman OF, el Fari 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94(5):575–9. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90093-2](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90093-2) PMID: 11132393
15. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Panorama do estado do Rio de Janeiro e estimativa da população residente em 2018. [Internet]. [citado 24 de setembro de 2018]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rj/panorama>
16. Ministério da Saúde, DATASUS. Leishmaniose Tegumentar Americana. Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação–Sinan Net. [Internet]. 2018 [citado 24 de setembro de 2018]. Disponível em: <http://tabn.et.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan/def>
17. Azeredo-Coutinho RBG, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and Leishmania amazonensis infection in Rio de Janeiro

- State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101(7):735–7. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.01.005> PMID: 17368698
18. Lyra MR, Pimentel MIF, Madeira M de F, Antonio L de F, Lyra JP de M, Fagundes A, et al. FIRST REPORT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi IN AN URBAN AREA OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2015; 57(5):451–4. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500016> PMID: 26603237
  19. Oliveira Neto MP, Grimaldi G, Momen H, Pacheco RS, Marzochi MC, McMahon Pratt D. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani* chagasi. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986; 81(3):303–9. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761986000300006> PMID: 3574128
  20. Pres MQ, Madeira M de F, VREP Bittencourt, Pacheco R da S. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47(2):243–6. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0007-2013> PMID: 24861303
  21. Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, et al. Mixed infection with *Leishmania (Vivax) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100(5):442–5. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.07.011> PMID: 16257024
  22. Oliveira Neto MP, Marzochi MC, Grimaldi Júnior G, Pacheco RS, Toledo LM, Momen H. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1986; 80(6):587–92. <https://doi.org/10.1080/00034983.1986.11812072> PMID: 3675032
  23. Rogers DJ, Randolph SE. Studying the global distribution of infectious diseases using GIS and RS. *Nat Rev Microbiol.* 2003; 1(3):231–7. <https://doi.org/10.1038/nrmicro776> PMID: 15035027
  24. Rushton G. Public health, GIS, and spatial analytic tools. *Annu Rev Public Health.* 2003; 24:43–56. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.24.012902.140843> PMID: 12471269
  25. Nuckols JR, Ward MH, Jarup L. Using Geographic Information Systems for Exposure Assessment in Environmental Epidemiology Studies. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(9):1007–15. <https://doi.org/10.1289/ehp.6738> PMID: 15198921
  26. Vieira CP, Oliveira AM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Chiaravalloti Neto F. Temporal, spatial and spatiotemporal analysis of the occurrence of visceral leishmaniasis in humans in the City of Birigul, State of São Paulo, from 1999 to 2012. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47(3):350–8. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0047-2014> PMID: 25075487
  27. Pavli A, Maltezos HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis.* 2010; 14(12):e1032–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.06.019> PMID: 20952234
  28. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Cascio A. Leishmaniasis in travelers: A literature review. *Travel Med Infect Dis.* 2014; 12(6):563–81.
  29. Brahim LR, Valet-Rosalino CM, Antônio L de F, Pimentel MIF, Lyra MR, Paes LE de C, et al. Low dose systemic or intralesional meglumine antimoniate treatment for American tegumentary leishmaniasis results in low lethality, low incidence of relapse, and low late mucosal involvement in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil (2001–2013). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017; 112(12):838–43. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160478> PMID: 29211245
  30. Ribeiro AI, Olhero A, Teixeira H, Magalhães A, Pina MF. Tools for Address Georeferencing—Limitations and Opportunities Every Public Health Professional Should Be Aware Of. *Noor AM, organizador. PLoS ONE.* 2014; 9(12):e114130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114130> PMID: 25469514
  31. Braga GH. Rio de Janeiro é o destino preferido dos turistas estrangeiros que visitam o Brasil a lazer—Ministério do Turismo [Internet]. 2015 [citado 5 de agosto de 2018]. Disponível em: <http://www.turismo.gov.br/%C3%BAltimas-not%C3%ADcias/5705-rio-destino-preferido-dos-estrangeiros-que-visitam-o-brasil-a-lazer>
  32. Caumes E, Carrikre J, Guernonprez G, Bricaire F, Danis M, Gentilini M. Dermatoses Associated with Travel to Tropical Countries: A Prospective Study of the Diagnosis and Management of 269 Patients Presenting to a Tropical Disease Unit. 1995; 7.
  33. SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO LEISHMANIOSES 002/2017. Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Rio de Janeiro—01/01/2007 a 07/11/2017. [Internet]. GERÊNCIA DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES E ZOONOSES—GDTVZ; 2017 [citado 5 de agosto de 2018]. Disponível em: <http://www.rjocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=yxZJtrWkVA%3D>
  34. da Silva LA, de Sousa, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(1):77–83. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.001> PMID: 19913112

35. Pacheco RS, Grimaldi G, Momen H, Morel CM. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. *Parasitology*. 1990; 100 Pt 3:393–8.
36. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93(5):663–8. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761998000500018> PMID: 9830535
37. Grimaldi G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 44(6):645–61. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.645> PMID: 1858968
38. Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Votipni AC, Almeida R, Sierra Romero GA. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health*. 2006; 11(9):1388–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01695.x> PMID: 16930261
39. Pacheco RS, Lopes UG, Morel CM, Grimaldi Jr G, Momen H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: *Leishmania Taxonomie et Phylogenese Application Eco-Epidemiologique*. Montpellier; 1986. p. 57–65. (Coll. Int. CNRS/INSERM, 1984).
40. Oliveira FS, Valette-Rosalino CM, Pacheco SJ, Costa F, Schubach AO, Pacheco RS. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. *Parasit Vectors*. 2013; 6(1):189.
41. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(7):3126–32. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3126-3132.2003> PMID: 12843052
42. Boté MC, Mauricio IL, Miles MA, Cupolillo E. New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of *Leishmania* (*Viannia*) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012; 6(11). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3486886/>
43. Davey JW, Blaxter ML. RADSeq: next-generation population genetics. *Brief Funct Genomics*. 2010; 9(5–6):416–23. <https://doi.org/10.1093/bfgp/eliq031> PMID: 21266344
44. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. setembro de 1994; 89(3):435–43. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761994000300027> PMID: 7476229
45. Figueira L de P, Zanotti M, Pinheiro FG, Franco AMR. [Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(5):512–4. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822008000500016> PMID: 19009197
46. 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. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150128> PMID: 26517660
47. Simon S, Nacher M, Carme B, Basurko C, Roger A, Adenis A, et al. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: revising epidemiology with PCR-RFLP. *Trop Med Health* [Internet]. 2017; 45(1). Disponível em: <http://tropmedhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41182-017-0045-x>
48. Bilbao-Ramos P, Dea-Ayuela MA, Cardenas-Alegría O, Salamanca E, Santalla-Vargas JA, Benito C, et al. Leishmaniasis in the major endemic region of Plurinational State of Bolivia: Species identification, phylogeography and drug susceptibility implications. *Acta Trop*. 2017; 176:150–61. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.026> PMID: 28751163
49. Kato H, Gomez EA, Martini-Robles L, Muzzio J, Velez L, Calvopiña M, et al. Geographic Distribution of *Leishmania* Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. Fujiwara RT, organizador. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(7):e0004844. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004844> PMID: 27410039
50. Solomon M, Schwartz E. [CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN ISRAEL 2016—AN UPDATE]. *Harefuah*. 2016; 155(10):626–31. PMID: 28530056
51. Cataldo JI, Conceição-Silva F, Antônio L de F, Schubach A de O, Marzochi MC de A, Valette-Rosalino CM, et al. Favorable responses to treatment with 5 mg SbV/kg/day meglumine antimoniate in patients with American tegumentary leishmaniasis acquired in different Brazilian regions. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018; 51(6):769–80. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0464-2017> PMID: 30517530
52. Carvalho SH, Frézard F, Pereira NP, Moura AS, Ramos LMQC, Carvalho GB, et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. *Trop Med Int Health*. 2019; 24(4):380–91. <https://doi.org/10.1111/tmi.13210> PMID: 30681239

## 5. DISCUSSÃO

Uma das lacunas na epidemiologia da infecção humana por leishmaniose cutânea está relacionada ao risco de transmissão nas atividades humanas em cada contexto. Nossos resultados mostram que, no estado do Rio de Janeiro, Brasil, a maior parte dos casos é autóctone e acontece nas áreas de moradia dos indivíduos, e uma proporção muito menor ocorre em condições de deslocamento por motivos de imigração, trabalho ou lazer.

A área de transmissão, que foi extensa no estado do Rio de Janeiro, distribuiu-se segundo nosso estudo predominantemente em áreas urbanas. No passado, a endemia no Brasil era rural (TEMPONI et al., 2018), o que ainda acontece em parte do Norte e Nordeste do país (ARAÚJO et al., 2016; NUNES; ARAÚJO; CALHEIROS, 2010). No Rio de Janeiro, ela parece assemelhar-se a estados das regiões Sul e Sudeste (CORTE et al., 1996; BUSTAMANTE et al., 2009; DETONI et al., 2019).

A maioria dos casos na cidade do Rio de Janeiro foi em bairros que circundam alguns maciços e áreas florestais de preservação ambiental. Isto também aconteceu nos municípios da região serrana do estado do Rio de Janeiro; outras áreas foram ocasionalmente afetadas. A tendência histórica da doença no Rio de Janeiro mostra um aumento em áreas periféricas (KAWA; SABROZA, 2002; MARZOCHI, 1992; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Kawa e Sabroza (2002) levantaram a hipótese de unidades espaciais com riscos diferenciados, defendendo que a urbanização da cidade criou condições para o estabelecimento de focos bem definidos com maior possibilidade de contato entre indivíduos suscetíveis e vetores. Isto poderia ser traduzido como a existência de áreas livres de infestação interpoladas com microhabitats próximos a áreas de preservação ambiental.

As atividades profissionais e os deslocamentos motivados por lazer ou por outros motivos podem colocar pessoas em risco aumentado de exposição à infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. A literatura médica relaciona algumas atividades profissionais ao adoecimento por leishmaniose cutânea, particularmente o contingente militar, tanto no Velho Mundo (ARONSON et al., 2010; ELSTON; MILLER, 2004; JACOBSON, 2011; MATHESON; WILLIAMS; BAILEY, 2012; PLOURDE et al., 2012; VAN THIEL et al., 2010a; VAN THIEL et al., 2010b; VICKERY et al., 2008; WILLARD et al., 2005) quanto no Novo Mundo (ANDRADE et al., 2005b; BAILEY, 2011; BANZET, 2000; BERGER et al., 2006; DANTAS-TORRES et al., 2017; GUERRA et al., 2003; LIGHTBURN et al., 2002; ORÉ et al., 2010; PATINO et al., 2017; PIMENTEL et al., 2011; SILVEIRA et al., 2002; VAN THIEL et al., 2011). Além disso, a leishmaniose cutânea encontra-se entre as condições dermatológicas mais comuns entre turistas que retornam a seus países de origem vindos de países tropicais (CAUMES et al., 1995; ERGEN; KING, TULLER, 2015; LAWN et al., 2003; SOLOMON et al., 2011; STEWARDSON et al., 2010; VANBRABANT; VAN DEN BROUCKE; SOENTJENS, 2015).

Em nosso estudo, considerando uma coorte de pacientes atendidos em um centro de referência para leishmaniose tegumentar americana na cidade do Rio de Janeiro, casos de leishmaniose tegumentar foram estudados com relação às atividades profissionais desempenhadas pelos pacientes, bem como às atividades de lazer e deslocamentos que propiciaram a exposição à infecção por espécies dermatrópicas de *Leishmania*.

Centros de referência para casos de leishmaniose em países ou áreas não endêmicas ou de baixa endemicidade são importantes, porque a leishmaniose cutânea pode gerar dificuldades diagnósticas entre profissionais de saúde não familiarizados com a doença, mesmo quando as lesões são típicas (KUNA et al., 2019). Nos centros de referência para doenças infecciosas geralmente estão disponíveis exames diversificados que permitem a confirmação diagnóstica (CAUMES et al., 1995; KUNA et al., 2019). O exame direto de material coletado da lesão é um exame simples, de fácil execução e com boa efetividade para diagnóstico (MELLO et al., 2011), e tem sido empregado em serviços de vários países (KUNA et al., 2019; SOLOMON et al., 2019), bem como exame histopatológico e PCR (ACHTMAN et al., 2016; KUNA et al., 2019; SOLOMON et al., 2019). O LapClin Vigileish, INI/Fiocruz é um centro de referência para o diagnóstico e tratamento da LTA em território brasileiro, recebendo pacientes que se infectaram no estado do Rio de Janeiro, em outras unidades federativas do país ou mesmo do exterior (BRAHIM et al., 2017; MIRANDA et al., 2019; PIMENTEL et al., 2011), dispondo de vários exames para diagnóstico (BARROSO-FREITAS et al., 2009; FAGUNDES et al., 2010; MELLO et al., 2011; QUINTELLA et al., 2009) e de profissionais experientes no manejo da doença (BRAHIM et al., 2017; SAHEKI et al., 2017). Os atendimentos de pacientes com LTA no LaPClin Vigileish entre 2001 e 2015 corresponderam a aproximadamente 39% dos casos notificados no RJ no mesmo período (DATASUS, 2020a; DATASUS, 2020b), refletindo com razoabilidade a endemia no estado.

O gênero mais afetado foi o sexo masculino e a idade mais acometida foi a faixa etária dos adultos, o que está em concordância com dados da Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro para a leishmaniose tegumentar americana (2018) e com dados do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2017). Uma distribuição entre os sexos mais equitativa acontece quando a exposição ocorre no domicílio e no peridomicílio (BUSTAMANTE et al., 2009; MARZOCHI, 1992; MONTEIRO et al., 2009; VELEZ et al., 2001). Já a exposição que ocorre por motivos laborais geralmente resulta em diferenças entre sexos e faixas etárias que tendem a refletir a distribuição em determinada profissão, geralmente com maior adoecimento de indivíduos do sexo masculino e adultos (ABDELLATIF; EL-MABROUK; EWIS, 2013; ARAUJO et al., 2016; DEDET; PRADINAUD; GAY, 1989; DETONI et al., 2019; EID et al., 2018; RAWLINGS et al., 2001; TELES et al., 2015; WEIGEL et al., 1994). Entretanto, podem existir diferenças biológicas que expliquem o

predomínio masculino na doença (LOCKARD et al, 2019; SOARES; ABAD-FRANCH; FERRAZ, 2014). Em nossa casuística, a análise segundo as atividades laborais mostrou um predomínio masculino em todas as categorias, à exceção dos indivíduos restritos à casa (donas de casa, aposentados, pré-escolares, pacientes psiquiátricos, desempregados e que nunca trabalharam) e dos profissionais de saúde. Nos indivíduos restritos à casa, a maior oportunidade para infecção ocorre no domicílio ou peridomicílio, e depende da adaptação dos insetos vetores às moradias humanas e abrigos de animais (MARZOCHI, 1992; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Em nossa casuística encontramos uma grande diversidade de categorias profissionais, o que é compatível com um padrão de transmissão predominantemente periurbano ou urbano. A modificação do padrão rural para um padrão urbano na LC em algumas localidades se traduz em um maior acometimento de categorias profissionais presentes neste último meio (BUSTAMANTE et al., 2009; CORTE et al., 1996; DETONI et al., 2019; NUNES; ARAÚJO; CALHEIROS, 2010)

O acometimento de crianças abaixo de 10 anos de idade é utilizado como um parâmetro de transmissão no domicílio e peridomicílio, e o Brasil apresenta uma distribuição etária de casos de LTA com pequena porcentagem de crianças (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2019). A porcentagem de crianças com LTA é baixa no LaPClin Vigileish (SENNA et al., 2020), e o percentual de menores de 10 anos foi de cerca de 7% em nosso estudo, entretanto isso pode configurar um viés, já que esta não é uma instituição dirigida para o atendimento de pacientes infantis.

O acometimento por leishmaniose tegumentar em indivíduos que se deslocam por motivos laborais, por lazer ou por migrações gera demandas com relação ao diagnóstico e a medidas de prevenção e controle da doença (BARRY; KOSHELEV; SUN, 2014; MANSUETO et al., 2014; PAVLI; MALTEZOU, 2010). Algumas vezes, casos de pacientes com lesões cutâneas persistentes, associados a uma história de deslocamentos previamente ao surgimento destas, pode levar à suspeição da doença e à realização de exames que permitam o diagnóstico (ACHTMAN et al., 2016). O retardo no diagnóstico ou o equívoco no diagnóstico (KELLY, BAUDRY; PEYRON, 2012; SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006) são frequentes quando o indivíduo procura atendimento em uma área não endêmica para a doença. Estes inconvenientes geralmente são explicados pela falta de conhecimento dos médicos de áreas não endêmicas sobre a leishmaniose tegumentar (POEPPL et al., 2013; ZAGHI et al., 2011), o que pode levar a condutas terapêuticas erradas (BAILEY; LANGMAN, 2014; BERENS-RIHA et al., 2009; DOWNING; WOC-COLBURN; TYRING, 2014; ERGEN; KING; TULI, 2015; LAURENT et al., 2017; SCHLEUCHER et al., 2008). Os exames realizados no LaPClin Vigileish permitem um diagnóstico seguro e instituição de tratamento oportuno, inclusive com possibilidade de identificação de espécies (MIRANDA et

al, 2019). Recomenda-se, também, que o conhecimento sobre a leishmaniose cutânea seja difundido entre os profissionais de saúde, mesmo em áreas não endêmicas (CARGNELUTTI et al., 2016). O LaPClin Vigileish treina anualmente dezenas de profissionais de saúde de todo o Brasil e até do exterior no diagnóstico e tratamento de LTA.

Em nosso estudo, os motivos de exposição em pacientes não autóctones do RJ cujo local provável de infecção (LPI) foi no Norte do Brasil se associaram principalmente com viagens por motivo profissional; naqueles cujo LPI foi no Nordeste se associaram com migrações; e naqueles com LPI na Região Sudeste a exposição se associou em grande parte com atividades de lazer. Quando não se considerou a autoctonia, o principal motivo de exposição foi a residência em áreas endêmicas, em 84,7% dos casos. Fatores como o desmatamento para construção de moradias podem interferir no número de casos de leishmaniose tegumentar em áreas urbanas e periurbanas (KAWA; SABROZA, 2002; SILVA; GURGEL, 2011); neste caso, a proximidade das matas (SILVA; GURGEL, 2011) ou a penetração nas matas por motivos como caça e pesca (CASTRO et al., 2005) podem ser fatores relevantes para o adoecimento.

O diagnóstico dos viajantes ou migrantes com leishmaniose tegumentar no LaPClin Vigileish, INI/Fiocruz entre 2000 e 2015 foi confirmado principalmente através da cultura de fragmentos de lesão coletados por procedimento de biópsia, o que permitiu a identificação da espécie de *Leishmania* em grande parte dos casos através da técnica de eletroforese de isoenzimas multilocus. Naqueles nos quais esta técnica não foi passível de ser realizada, a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP) para o gene da proteína do choque térmico 70 (*hsp70C*) se mostrou uma boa alternativa, e apenas em um indivíduo foi necessário utilizar a técnica do espaçador interno transcrito (ITS1 rDNA) para determinação da espécie de *Leishmania*. Estes métodos moleculares têm sido empregados para diagnóstico de espécie em outros países (KUNA et al., 2019; SOLOMON et al., 2019). A espécie mais encontrada foi *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que é a espécie predominante no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). *L. (V.) braziliensis* foi identificada em indivíduos provenientes das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país. Por outro lado, outras espécies foram identificadas [*L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, bem como variante genética de *L. (V.) braziliensis*] em pacientes provenientes das regiões Norte e Nordeste. Como uma preocupação adicional, existe a possibilidade de introdução de uma espécie em uma área na qual esta espécie não era previamente endêmica. O estabelecimento de uma espécie originalmente não autóctone dependeria da existência de vetores suscetíveis e de condições climáticas e de vegetação que favorecessem sua multiplicação, além de outros fatores como a existência de reservatórios (CLABORN et al., 2008). Deste modo, o conhecimento das espécies infectantes em pacientes não autóctones e autóctones é importante para a vigilância epidemiológica da

doença, já que se reflete nas formas clínicas encontradas e na resposta terapêutica esperada, sendo fator a ser levado em consideração na escolha do tratamento (ARONSON et al., 2010; BLUM et al., 2014; HODIAMONT et al., 2014).

No caso dos militares, a exposição se deveu predominantemente a motivos laborais. Os militares atendidos no LaPClin Vigileish no período estudado compreenderam em muitos casos oficiais das diversas armas que tinham sido infectados durante exercícios de comando na selva. Todos eram do sexo masculino, e a grande maioria era de adultos jovens, o que está de acordo com os dados da literatura relacionados aos contingentes militares infectados (GLENNIE; BAILEY, 2010; BERGER et al., 2006). Um dos jovens oficiais foi exposto à infecção durante atividades de cunho militar desenvolvidas no Equador (PIMENTEL et al., 2011). Estes militares foram avaliados e tratados segundo os procedimentos de rotina do LaPClin Vigileish, obtendo cura de suas lesões ao final do tratamento. Como não temos acesso às informações sobre adoecimento por LTA nos grupos enviados aos exercícios militares em área de selva, não houve como avaliar a porcentagem de infectados em relação ao total de militares treinados. A porcentagem de adoecimento entre militares enviados para exercícios de comando na selva em áreas endêmicas para LTA pode ser tão alta como 25% dos treinados (ORÉ et al., 2015; VAN THIEL et al., 2011). No Brasil há poucos estudos relacionados ao acometimento de militares em áreas endêmicas. Guerra e colaboradores (2003) descreveram 48 militares com LTA diagnosticada após exercícios militares na floresta amazônica em área próxima ao município de Manaus, com confirmação parasitológica através de escarificação das lesões em 89,6% dos casos. Em Pernambuco foi encontrada uma porcentagem de infecção, traduzida pela positividade à IDRM, de 25,3% (89 de 370 militares), dentre os quais 23 casos de LTA confirmados clínica, imunológica e parasitologicamente, no período entre 2002 e 2003 (ANDRADE et al., 2005); a grande maioria destes militares (94,7%) relatava utilização de medidas de proteção como uso de mangas longas e repelentes. Novo surto foi relatado na área em 2006, com 75 militares acometidos após treinamentos (ANDRADE et al., 2009), quando se sugeriu intensificação das orientações para uso das medidas de proteção individual. Estudos entomológicos em bases de treinamento militar na Amazônia (GOMES et al., 2013) e em Pernambuco (ANDRADE et al., 2005) detectaram a presença de flebotomos nestas áreas, evidenciando o risco de exposição à infecção.

Quanto aos agricultores, há claramente uma sobreposição de motivos laborais com residência, já que estes residem predominantemente em áreas rurais ou periurbanas, onde desempenham suas atividades profissionais. Em várias áreas do Brasil a ocorrência de LTA predomina em trabalhadores rurais ou em área rural, como na Região Nordeste (ARAÚJO et al., 2016; PEDROSA; XIMENES, 2009) e áreas do Sul do Brasil (CASTRO et al., 2005; DETONI et al., 2019). Alguns estudos na literatura comprovam a presença de vetores da

LTA em áreas cultivadas (ALEXANDER et al., 2002), com diferentes espécies de flebotomíneos conforme a cultura, como plantações de café e cana de açúcar (MIRANDA et al., 2015; MORENO et al, 2019). Entre os agricultores, as medidas preventivas devem ser implementadas precocemente devido à residência próxima aos locais de trabalho (EID et al., 2018), e a educação em saúde deve ser constante. Os domicílios rurais deveriam ser construídos à distância dos locais de cultivo (MORENO et al., 2019). A dificuldade de acesso às unidades de saúde pelos trabalhadores rurais aumenta a complexidade da situação, pela residência em áreas remotas e acesso por estradas ou caminhos precários. O longo tempo do trajeto e as dificuldades econômicas no custeio do transporte, inclusive pela necessidade de suspender o trabalho enquanto se procura assistência médica, são outros complicadores; além disso, o problema muitas vezes não é solucionado nas unidades básicas de saúde, e os pacientes são então referidos para unidades de maior complexidade. Estas dificuldades provavelmente se traduzem em retardo no diagnóstico, com possível agravamento do quadro (EID et al, 2019).

Nossos resultados de caracterização de espécies são compatíveis com a literatura. Os estudos genéticos das populações de *Leishmania* em diferentes partes do Brasil mostram uma grande diversidade de espécies e variantes na Amazônia (GRIMALDI Jr et al., 1991; SILVA et al, 2006) e no nordeste do Brasil (BRITO et al., 2009). No Rio de Janeiro, assim como outros estados da região sudeste do Brasil, *L. (V.) braziliensis* é largamente predominante (BAPTISTA et al., 2009; GOMES et al., 1995). Embora se considere em geral uma espécie geneticamente homogênea, este comportamento parece diferir entre regiões geográficas (CUPOLILLO et al., 2003). Nós encontramos poucas variantes de *L. (V.) braziliensis*. As demais espécies foram encontradas principalmente em condições de deslocamento por trabalho, como no caso dos militares que participaram de treinamento de comando na selva. A limitação dos resultados de caracterização de espécies e variantes foi a elevada proporção de perdas de amostras por diferentes motivos (ausência de crescimento em cultura após criopreservação, contaminação por fungos e bactérias). Por outro lado, pode haver proximidade genética entre cepas de *L. (V.) braziliensis* do Norte e do Sul do Brasil (ISHIKAWA et al. 2002).

Novos estudos poderiam esclarecer melhor o papel das atividades profissionais e do deslocamento no adoecimento por leishmaniose tegumentar americana no estado do RJ, permitindo o aprimoramento das medidas de prevenção e controle. A verificação ao longo do tempo das espécies parasitárias poderia, adicionalmente, prover respostas para a questão da capacidade ou não de instalação de espécies não autóctones em território fluminense.

## 6. CONCLUSÕES:

- ✓ Os pacientes com leishmaniose cutânea atendidos no INI/Fiocruz entre 2000 e 2015 apresentaram marcado predomínio de homens. A faixa etária mais acometida foi entre 20 e 39 anos de idade. Encontraram-se pacientes com predomínio do provável local de transmissão no domicílio e peridomicílio, como por exemplo nos indivíduos restritos ao lar (crianças pré-escolares, donas de casa, aposentados, pacientes com distúrbios psiquiátricos); os que apresentaram local provável de transmissão associado predominantemente com as atividades laborais (militares; biólogo, geólogo e geotécnico em trabalho de campo; engenheiro ambiental e florestal; montanhista; cinematografista após trabalho em área de floresta; técnico em petróleo; trabalhador em pedreira); indivíduos com transmissão provável fora do Rio de Janeiro, que imigraram para este estado; e aqueles com local provável de transmissão associado com viagens de lazer para áreas endêmicas.
  
- ✓ A área predominante de infecção foi a residência em área endêmica. Quanto à transmissão por deslocamentos relacionados a atividades de trabalho, os militares representaram importante parcela destes indivíduos. Os migrantes e os indivíduos cuja transmissão deveu a deslocamentos por motivos de lazer constituíram percentuais menores do total de casos. A espécie predominante em todas as situações foi *L. (V.) braziliensis*, sendo responsável pela quase totalidade dos casos quando o motivo de infecção foi residência em área endêmica. A maior variedade de espécies e variantes foi encontrada quando a transmissão ocorreu por deslocamentos devido a atividades laborais. A endemia nos casos autóctones do estado do Rio de Janeiro predominou em áreas urbanas do estado do Rio de Janeiro; houve maior ocorrência nas cidades em torno da área florestada da região serrana. No município do Rio de Janeiro, casos autóctones ocorreram principalmente nos bairros que circundam os maciços da Pedra Branca e Gericinó-Mendanha, áreas florestadas no interior da região urbana.
  
- ✓ Quanto aos isolados de 171 pacientes com história de deslocamento, estes foram identificados como *L. (Viannia) braziliensis* em 104 casos (80,8%) além de *L. (V.) naiffi* (7,7%), *L. (V.) guyanensis* (6,7%), *L. (Leishmania)*

*amazonensis* (1%), e variantes genéticas de *L. (V.) braziliensis* (3,8%). Os mapas de fluxo mostraram que o local provável de infecção incluiu quatro países, 19 estados brasileiros e 18 cidades do estado do Rio de Janeiro. Os locais prováveis de infecção em estados diferentes do Rio de Janeiro foram no Amazonas (32), Bahia (18) e Ceará (15 pacientes). O conhecimento do fluxo migratório e da localização geográfica dessas espécies de *Leishmania* trazidas de outros locais pode contribuir para a vigilância da LC no estado do Rio de Janeiro, já que existe a possibilidade de que estas espécies possam ser introduzidas em áreas suscetíveis com flebotomíneos e se estabelecer em território fluminense, com repercussões nas apresentações clínicas, no tratamento e no controle da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABADIR, A.; PATEL, A.; HAIDER, S. Systemic therapy of New World cutaneous leishmaniasis: a case report and review article. **Can. J. infect. Dis. Med. Microbiol.**, v. 21, n. 2, p. e79-e83, 2010.

ABDELLATIF, M. Z. M.; EL-MABROUK, K.; EWIS, A. A. An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Al-Jabal Al-Gharbi, Libya. **Korean J. Parasitol.**, v. 51, n. 1, p. 75-84, 2013.

ACHTMAN, J. C. et al. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) panamensis* in 2 travelers. **J. Am. Acad. Dermatol.**, V. 2, p. 95-7, 2016.

AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

ALEXANDER, B.; OLIVEIRA, E. B.; HAIGH, E.; ALMEIDA, L. L. Transmission of *Leishmania* in coffee plantations of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 627-630, 2002.

AMATO, V. S.; ANDRADE, H. F.; DUARTE, M. I. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Trop.**, v. 85, n. 1, p. 39 – 49, 2003.

ANDRADE, M. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 388, n. 3, p. 229-33, 2005a.

ANDRADE, M. S. et al. Sandfly fauna in a military training área endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1761-1767, 2005b.

ANDRADE, M. S. et al. Novo surto de leishmaniose tegumentar americana em área de treinamento militar na Zona da Mata norte do Estado de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 5, p. 594-6, 2009.

ANTONIO, L. F. et al. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 375-80, 2014.

ANTONIO L. F. et al. Effect of secondary infection on epithelialisation and total healing of cutaneous leishmaniasis lesions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 112, n.9, p. 640-646, 2017.

ARAUJO, A. R. et al. Risk factors associated with American cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 58, p.86, 2016.

ARONSON, N. E. et al. Safety and efficacy of intravenous sodium stibogluconate in the treatment of leishmaniasis: Recent U.S. military experience. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, p.1457–64, 1998.

ARONSON, N. E. et al. A randomized controlled trial of local heat therapy versus intravenous sodium stibogluconate for the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 3, p. e628, 2010.

AZEREDO-COUTINHO, R. B. et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, p. 735 –7, 2007.

BAPTISTA, C. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentar leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. **Experim. Parasitol.**, v. 42, p. 317 – 22, 2009.

BARRAL, A. et al. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 256-9, 1995.

BART, A. et al. Imported leishmaniasis in the Netherlands from 2005 to 2012: epidemiology, diagnostic techniques and sequence-based species typing from 195 patients. **Euro. Surveill.**, v. 18, n. 30, p. 20544, 2013.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 328-37, 2004.

BAILEY, M. S. Cutaneous leishmaniasis in British troops following jungle training in Belize. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 9, n. 5, p. 253-4, 2011.

BAILEY, M. S.; LANGMAN, G. Misdiagnosis of cutaneous leishmaniasis and recurrence after surgical excision. **J. R. Army Med. Corps.**, v. 160, n. 4, p. 314-6, 2014.

BANZET, S. Epidémies de leishmanioses cutanées chez les militaires en opération en Guyane française. **Med. Trop. (Mars.)**, v. 60, n. 3, p. 297-302, 2000.

BAPTISTA, C. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. **Exp. Parasitol.**, v. 121, n. 4, p. 317-22, 2009.

BARROSO-FREITAS, A. P., et al. Accuracy of na ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103, p. 383-9, 2009.

BARRY, M. A., KOSHELEV, M. V., SUN, G. S. Case report: Cutaneous leishmaniasis in Cuban immigrants to Texas who traveled through the Darién Jungle, Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, n. 2, p. 345–347, 2014.

BART, A. et al. Imported leishmaniasis in the Netherlands from 2005 to 2012: epidemiology, diagnostic techniques and sequence-based species typing from 195 patients. **Euro. Surveill.**, v.18, n.30, pii 20544, 2013.

BASHER, A. et al. Cutaneous leishmaniasis in immigrant workers returning to Bangladesh - An emerging problem. **Travel Med. Infect Dis.**, v. 19, p. 62-63, 2017.

BEDOYA-PACHECO, S. J. et al. Endemic tegumentary leishmaniasis in Brazil: correlation between level of endemicity and number of cases of mucosal disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 6, p. 901-905, 2011.

BEDOYA-PACHECO, S. J. et al. Estigmatização social pela leishmaniose cutânea no estado do Rio de Janeiro. **Rev. Eletron. Comun. Inf. Inov. Saude**, v. 11, n. 3, p. e-ISSN 1981-6278, 2017.

BELLALI, H. et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis prevalence among farmers in Central Tunisia, 2014. **J. Agromedicine.**, v. 22, n. 3, p. 244-250, 2017.

BERENS-RIHA, N. et al. Cutaneous leishmaniasis (*Leishmania tropica*) in a German tourist after travel to Greece. **J. Travel Med.**, v. 16, n. 3, p. 220–222, 2009.

BERGER, F. et al. Épidémie de leishmaniose cutanée chez des militaires de retour de mission en Guyane. **Rev. Epidemiol. Sante Publique**, v. 54, n. 3, p. 213-21, 2006.

BILBAO-RAMOS, P. et al. Leishmaniasis in the major endemic region of Plurinational State of Bolivia: Species identification, phylogeography and drug susceptibility implications. **Acta Trop.**, v. 176, p. 150–61, 2017.

BILGIC-TEMEL, A.; MURRELL, D. F.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. **Int. J. Women Dermatol.**, v. 5, p. 158-65, 2019.

BLUM, J. et al. LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014. **J Travel Med.**, v. 21, n.2, p. 116 – 29, 2014.

BOITÉ, M. C. et al. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of

*Leishmania (Viannia)* parasites based on multilocus sequence analysis. PLoS Negl. Trop. Dis., v. 6, n. 11, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3486886/> Acesso em 26/06/2018.

BRAGA GH. Rio de Janeiro é o destino preferido dos turistas estrangeiros que visitam o Brasil a lazer—Ministério do Turismo 2015. Disponível em: <http://www.turismo.gov.br/%C3%BAltimas-not%C3%ADcias/5705-rio-destino-preferido-dos-estrangeiros-que-v%C3%AAm-ao-brasil.html> Citado em 05 de agosto de 2018.

BRAHIM, L. R. et al. Low dose systemic or intralesional meglumine antimoniate treatment for American tegumentary leishmaniasis results in low lethality, low incidence of relapse, and low late mucosal involvement in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil (2001-2013). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 12, p. 838-43, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**, 2ª Edição atualizada, Brasília, O Ministério, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, p. 190, 2017. Disponível em: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf) Citado em 01 de junho de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2020a. **Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018**. Disponível em: <http://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LT-Casos.pdf> Citado em 12 de fevereiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2020b. **Coeficiente de detecção de casos de leishmaniose tegumentar americana por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes regiões e Unidades Federadas**. Disponível em: <http://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LT-Coef-Deteccao.pdf> Citado em 12 de fevereiro de 2020.

BRASIL. Ministério do Trabalho. Classificação Brasileira de Ocupações. <https://www.guiatrabalho.com.br/mte-ministerio-do-trabalho-cbo.html> Citado em 20 de fevereiro de 2020.

BRILHANTE, A. F. et al. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) in an area of fishing tourism in central-western Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 57, n. 3, p. 233-8, 2015.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of Northeastern Brazil. **Trop. Med. Int. Health**, v. 14, n. 10, p. 1278-86, 2009.

BRITO, M. E. F. et al. Occupationally acquired American cutaneous leishmaniasis. **Case Rep Dermatol Med.**, v. 2012, p. 279517, 2012.

BUSTAMANTE, M. C. et al. Epidemiological profile of cutaneous leishmaniasis in an endemic region in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Bras Parasitol. Vet.**, v. 18, n. 3, p. 34-40, 2009.

CANNELLA, A. P. et al. Short report: A cluster of cutaneous leishmaniasis associated with human smuggling. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 6, p. 847–850, 2011.

CARGNELUTTI, D. E., et al. Diagnosis of *Leishmania* infection in a nonendemic area of South America. **J. Microb. Immunol. Infect.**, v. 49, p. 809-12, 2016.

CASTRO, E. A. et al. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **Acta Trop.**, v. 93, n. 2, p.141-149, 2005.

CHAPPUIS, F. Place de la PCR en médecine des voyages. **Rev. Med. Suisse**, v. 7, n. 294, p. 991-2, 994, 2011.

CHEN, L. H. et al. Illness in long-term travelers visiting geosentinel clinics. *Emerg. Infect. Dis.*, v, 15, p.1774–81, 2009.

CLABORN, D. et al. Habitat analysis of North American sand flies near veterans returning from leishmania-endemic war zones. **Int. J. Health Geogr.**, v. 7, p. 65, 2008.

CARVALHO, B. M.; DIAS, C. M. G.; RANGEL, E. F. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Rio de Janeiro State, Brazil: species distribution and potential vectors of leishmaniasis. **Rev. Bras. Entomol.**, v. 58, n. 1, p. 77–87, 2014.

CARVALHO, L. M. V. et al. Sporotrichoid leishmaniasis: a cross-sectional clinical, epidemiological and laboratory study in Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Instit. Med. Trop. São Paulo**, v. 59, p. e33, 2017.

CARVALHO, S. H. et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Trop. Med. Int. Health**, v. 24, n. 4, p. 380–91, 2019.

CATALDO, J. I. et al. Favorable responses to treatment with 5 mg SbV/kg/day meglumine antimoniate in patients with American tegumentary leishmaniasis acquired in different Brazilian regions. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 51, n. 6, p. 769–80, 2018.

CAUMES, E. et al. Dermatoses associated with travel to tropical countries: a prospective study of the diagnosis and management of 269 patients presenting to a tropical disease unit. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, n. 3, p. 542-548, 1995.

CHEN, L.H. et al. Illness in long-term travelers visiting geosentinel clinics. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 15, n. 11: 1774 – 1781, 2009.

COHEN, J. M. et al. Pink plaque on the arm of a man after a trip to Mexico: cutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Online J.**, v. 21, n. 6, p: 13030/qt5jn0w4pd, 2015.

CONFALONIERI, U. E. C.; MARGONARI, C.; QUINTÃO, A. F. Environmental changes and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. **Acta Trop.**, v. 129, p. 33-41, 2014.

CORTE, A. A. et al. Aspectos eco-epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas. **Cad Saude Publica**, v. 12, n. 4, p. 465-472, 1996.

COSTA Jr., J. W.; MILNER Jr., D. A.; MAGUIRE, J. H. Mucocutaneous leishmaniasis in a US citizen. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 96, p. 573-577, 2003.

CHRISTEN, J. R. et al. Use of the intramuscular route to administer pentamidine isethionate in *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis increases the risk of treatment failure. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 26, p. S1477-8939(18)30040-1, 2018.

CROWE, A. et al. A case of imported *Leishmania infantum* cutaneous leishmaniasis; an unusual presentation occurring 19 years after travel. **BMC Infect. Dis.**, v.14, p.597, 2014.

CUPOLILLO, E. et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3126 – 3132, 2003.

CUPOLILLO, E. et al. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 73, n. 1–2, p. 145–55, 1995.

CUPOLILLO, E. et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3126–32, 2003.

CUPOLILLO, E., GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 3, p. 296-311, 1994.

CUPOLILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI Jr, G. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, p. 663–8, 1998.

ÇULHA, G., et al. [Imported cutaneous leishmaniasis cases detected in truck drivers in Hatay.] **Mikrobiyol Bul.**, v. 52, n. 3, p. 316-23, 2018.

DANTAS-TORRES, F. et al. Sand fly population dynamics and cutaneous leishmaniasis among soldiers in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 2, p. e0005406, 2017.

DARLING, M. D.; REICHENBERG, J. S.; GAVINO, A. C. New world cutaneous leishmaniasis: obstacles in initiating treatment with sodium stibogluconate in 2 travelers from Texas. **J. Drugs Dermatol.**, v. 12, n. 4, p. 476-478, 2013.

DATASUS. Ministério da Saúde. Doenças e agravos de notificação, 2001 – 2006 (SINAN). Leishmaniose tegumentar americana. Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanwin/cnv/ltarj.def> Acesso em 01/02/2020.

DATASUS. Ministério da Saúde. Doenças e agravos de notificação, 2007 em diante (SINAN). Leishmaniose tegumentar americana. Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/ltarj.def> Acesso em 01/02/2020.

DAVEY, J. W.; BLAXTER, M. L. RADSeq: next-generation population genetics. **Brief Funct. Genomics**, v. 9, n. 5–6, p. 416–23, 2010.

DÁVILA, A. M.; MOMEN H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 94, n. 6, p. 651–4, 2000.

DEDET, J. P.; PRADINAUD, R.; GAY, F. Epidemiological aspects of human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 5, p. 616-620, 1989.

DELGADO, O.; SILVA, S.; CORASPE, V., et al. Cutaneous leishmaniasis imported from Colombia to Northcentral Venezuela: Implications for travel advice. **Travel Med Infect Dis.**, v. 6, p. 376-379, 2008.

DETONI, M. B. et al. Temporal and spatial distribution of American tegumentary leishmaniasis in north Paraná: 2010–2015. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 52, p.e20180119, 2019.

DI MUCCIO, T. et al. Epidemiology of imported leishmaniasis in Italy: Implications for a European endemic country. **PLOS One**, v. 10, n.6, p. e0129418, 2015.

DILLON, N. L. et al. Leishmaniose cutânea acidental. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 35, n. 4, p. 385-7, 1993.

DOURADO, M. I. et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do estado da Bahia (Brasil). **Rev Saude Publica**, v. 23, n. 1, p. 2-8, 1989.

DOWNING, C. P.; WOC-COLBURN, L.; TYRING, S. K. Nasal erythema and crusting after a trip to the Venezuelan rainforest. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 312, n. 12, p.1250-1251, 2014.

EHEHALT, U. et al. Leishmaniasis acquired by travellers to endemic regions in Europe: A EuroTravNet multi-centre study. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 12, p.167-172, 2014.

EID, D. et al. Risk factors for cutaneous leishmaniasis in the rainforest of Bolivia: a cross-sectional study. **Trop. Med. Health.**, v. 46, p. 9, 2018.

EID, D. et al. Leishmaniasis patients' pilgrimage to access health care in rural Bolivia: a qualitative study using human rights to health approach. **BMC Int. Health Human Rights.**, v. 19, p. 12, 2019.

EIRAS, D. P., KIRKMAN, L. A., MURRAY, H. W. Cutaneous leishmaniasis: Current treatment practices in the USA for returning travelers. **Curr. Treat. Options Infect. Dis.**, v. 7, n. 1, p. 52-62, 2015.

EL TAI, N. O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n. 5, p. 575-9, 2000.

ELSTON, D. M.; MILLER, S. D. Leishmaniasis acquired in the Iraqi Theater of Operations: lessons learned. **Cutis**, v. 74, n. 4, p. 253-255, 2004.

ERGEN, E. N.; KING, A. H.; TULI, M. Cutaneous leishmaniasis: an emerging infectious disease in travelers. **Cutis**, v. 96, n. 4, p. E22-6, 2015.

FAGUNDES A. A reação intradérmica de Montenegro na clínica e na epidemiologia da leishmaniose tegumentar. Tese de doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2007.

FAGUNDES, A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 109-112, 2010.

FAGUNDES-SILVA, G. A. et al. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 797–800, 2015.

FATHI, R.; FATHI, A. A case of cutaneous leishmaniasis found in Indiana. **Dermatol. Online J.**, v. 19, n. 7, p. 18982, 2013.

FIELD, V. et al. Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008. **BMC Infect. Dis.**, v. 10, p. 330, 2010.

FIGUEIRA, L. P. et al. [Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 5, p. 512–4, 2008.

FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, n. 2, p. 238–45, 2010.

FUERTES, P. Z. et al. Clinical and epidemiological characteristics of imported infectious diseases in Spanish travelers. **J. Travel Med.**, v.17, n. 5, p. 303–309, 2010.

FURTADO, T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An Bras Dermatol.**, v. 55, n. 2, p. 81-86, 1980.

GALIOTO, P.; FORNARO V. A case of mucocutaneous leishmaniasis. **Ear Nose Throat J.**, v. 81, n. 1, p. 46-48, 2002.

GLENNIE, J. S.; BAILEY, M. S. UK Role 4 military infectious diseases at Birmingham Heartlands Hospital in 2005-9. **J. R. Army Med. Corps.**, v. 156, n. 3, p. 162-164, 2010.

GOMES, L. H. M. et al. Diversity and distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a military area in the state of Amazonas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 651-656, 2013.

GOMES, R. F. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas from Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. **Exp. Parasitol.**, v. 80, p. 681 – 7, 1995.

GONTIJO, B.; CARVALHO, L. American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2003; v. 36, n. 1, p. 71-80., 2003

GONZÁLEZ, M., R. et al. Evaluación de un brote de leishmaniasis tegumentaria americana en una comunidad rural del Estado Bolívar, Venezuela. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 1, p. 31-37, 2000.

GRAÇA, G. C. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 664-74, 2012.

GRIMALDI JR., G. et al. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 6, p. 645-61, 1991.

GRIMALDI JR, G et al. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 6, p. 645–61, 1991.

GUERRA, J. A. O. et al. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 587-90, 2003.

GUERY, R. et al. Liposomal amphotericin B in travelers with cutaneous and muco-cutaneous leishmaniasis: Not a panacea. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 11, p. e0006094, 2017.

GUTIERREZ, J. D. et al. Environmental and socio-economic determinants associated with the occurrence of cutaneous leishmaniasis in the northeast of Colombia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 111, p. 564–571, 2017.

HAIDER, S. et al. Cutaneous ulcer in a man returning from Central America. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 168, n. 5, p. 590-1, 2003.

HARMS, G. et al. Treatment of imported New World cutaneous leishmaniasis in Germany. **Int. J. Dermatol.**, v. 50, p. 1336–1342, 2011.

HERBINGER, K-H. et al. Skin disorders among travellers returning from tropical and non-tropical countries consulting a travel medicine clinic. **Trop. Med. Int. Health**, v. 16, n. 11, p. 1457–1464, 2011.

HERNÁNDEZ, A. M. et al. et al. Spatial epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: socioeconomic and demographic factors associated with a growing epidemic. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 113, n. 9, p. 560-8, 2019.

HERREMANS, T. et al. Increase of imported Leishmaniasis in the Netherlands: a twelve year overview (1996-2007). **Int. Health**, v. 2, n. 1, p. 42-46, 2010.

HERWALDT, B. L.; JURANEK, D.D. Laboratory-acquired malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis, and toxoplasmosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, n. 3, p. 313-323, 1993.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 14, n. 4, p. 659–88, 2001.

HILL, D. R. The burden of illness in international travelers. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 2, p. 115 - 117, 2006.

HODIAMONT, C. J. et al. Species-directed therapy for leishmaniasis in returning travellers: A comprehensive guide. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 5, p. e2832, 2014.

HYAMS, K. C. et al. Endemic infectious diseases and biological warfare during the Gulf War: a decade of analysis and final concerns. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n.5, p. 664–70, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Biblioteca. <https://biblioteca.ibge.gov.br> Citado em 20 de fevereiro de 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Panorama do estado do Rio de Janeiro e estimativa da população residente em 2018. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rj/panorama> Citado em 24 de setembro de 2018.

INSTITUTO PEREIRA PASSOS (IPP). <https://www.rio.rj.gov.br/web/ipp/exibeconteudo?id=4477445> Citado em 20 de fevereiro de 2020.

ISHIKAWA, E. A. et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, p. S111 – S121, 2002.

JACOBSON, R. L. Leishmaniasis in an era of conflict in the Middle East. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v, 11, n. 3, p. 247-58, 2011.

KATO, H. et al. Geographic distribution of *Leishmania* species in Ecuador based on the cytochrome B gene sequence analysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 7, p. e0004844, 2016.

KAWA, H.; SABROZA, P. C. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. **Cad. Saude Publica**, v. 18, n. 3, p. 853-65, 2002.

KELLY, P.; BAUDR, Y, T.; PEYRON, F. Imported cutaneous leishmaniasis in a short-term traveler returning from Central Mali - The role of PCR. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 10, n. 2, p. 97-100, 2012.

KNOBLOCH, J.; DEMAR, M. Accidental *Leishmania mexicana* infection in an immunosuppressed laboratory technician. **Trop. Med. Intern. Health**, v. 2, n. 12, p. 1152-5, 1997.

KOFF, A. B.; ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, n. 5 Pt 1, p. 693-708, 1994.

KORZENIEWSKI, K.; OLSZAŃSKI, R. Leishmaniasis among soldiers of stabilization forces in Iraq. Review article. **Int. Marit. Health**, v. 55, n. 1-4, p. 155-63, 2004.

KUJLDER, J. S. et al. *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis in 3 travelers returning from Israel to the Netherlands. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 22, n. 11, p. 2022-4, 2016.

KUNA, A., et al. Imported cutaneous leishmaniasis: a 13-year experience of a Polish tertiary center. **Adv. Dermatol. Allergol.**, v. 36, n. 1, p. 104-11, 2019.

LAINSON, R. et al. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 435-43, 1994.

LAURENT, K. et al. Cutaneous leishmaniasis in a Saudi Arabian soldier stationed in the United States. **Military Medic.**, v. 182, n. 7, p. e1953-e1956, 2017.

LAVERGNE, R. A. et al. Contribution of molecular diagnosis to the management of cutaneous leishmaniasis in travellers. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, n. 8, p. O528-530, 2014.

LAWN, S. D. et al. New World cutaneous leishmaniasis in returned travelers: treatment failures using intravenous sodium stibogluconate. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 443-5, 2003.

LAWN, S. D. et al. New world mucosal and cutaneous leishmaniasis: an emerging health problem among British travellers. **Q. J. M.**, v. 97, n. 12, p. 781-8, 2004.

LIGHTBURN, E. et al. Surveillance épidémiologique des leishmanioses tégumentaires en Guyane. Synthèse de données militaires sur 10 ans. **Med. Trop. (Mars.)**, v. 62, n. 5, p. 545-53, 2002.

LOCATELLI, F. M. et al. The isolation and molecular characterization of *Leishmania* spp. from patients with American tegumentary leishmaniasis in northwest Argentina. **Acta Trop.**, v. 131, p. 16-21, 2014.

LOCKARD, R. D.; WILSON, M. E.; RODRIGUEZ, N. E. Sex-related differences in immune response and symptomatic manifestations to infection with *Leishmania* species. **J. Immunol. Res.**, v. 2019, p. 4103819, 2019.

LYRA, M. R. et al. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in an urban area of Rio de Janeiro. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 57, p. 451-4, 2015.

MADEIRA, M. F. et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 5, p. 442–5, 2006.

MANFREDI, R. et al. American cutaneous leishmaniasis as a rare imported disease in Europe: a case report favorably treated with antimonial derivatives. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 17, n. 8, p. 793-795, 2001.

MANSUETO, P. et al. Leishmaniasis in travelers: a literature review. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 12, n. 6 Pt A, p. 563-81, 2014.

MARSDEN, P. D. et al. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, p. 561-2, 1984.

MARTINS, A. C. C. et al. Perception risk of transmission of zoonoses in a reference Center. **Rev. Eletron. Comun. Inf. Inov. Saúde**, v. 9, n. 3, p.1-14, 2015.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. **J. Bras. Med.**, v. 63, n. 5/6, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Pública**, v. 10, n. supl. 2, p. 359 – 75, 1994.

MATHESON, A.; WILLIAMS, R.; BAILEY, M.S. Cutaneous leishmaniasis in Royal Marines from Oruzgan, Afghanistan. **J. R. Army Med. Corps.**, v. 158, n. 3, p. 221-4, 2012.

MELO, H. A.; ROSSONI, D. F.; TEODORO, U. Spatial distribution of cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná, Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185401, 2017.

MELLO, C. X., et al. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 109, n. 3, p. 927-33, 2011.

MIRANDA, D. E. et al. Ecology of sand flies in a low-density residential rural area, with mixed forest/agricultural exploitation, in north-eastern Brazil. **Acta Trop.**, v. 146, p. 89-94, 2015.

MIRANDA, L. F. C. et al. Geospatial analysis of tegumentar leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil from 2000 to 2015: Species typing and flow of travelers and migrants with leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 11, p. e0007748, 2019.

MONTALVO, A. M. et al. Molecular and histological tools to diagnose an imported case of American cutaneous leishmaniasis in Cuba. **Int. J. Dermatol.**, v. 54, n. 10, p. 1175-9, 2015.

MONTALVO, A. M. et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. **Parasitology**, v. 137, n. 08, p. 1159–68, 2010.

MONTEIRO, W. M. et al. Population mobility and production of American tegumentary leishmaniasis in the state of Parana, southern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 5, p. 509–14, 2009.

MORENO, M. et al. Land use in relation to composition and abundance of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in five foci of domiciliar transmission of cutaneous leishmaniasis in the Andean region of Colombia. **Acta Trop.**, v. 203, p. 105315, 2020.

MORIZOT, G. et al. Cutaneous Leishmaniasis French Study Group. Travelers with cutaneous leishmaniasis cured without systemic therapy. **Clin. Infect. Dis.**, 2013, v. 57, p. 370 – 80, 2013.

MOSIMANN, V. et al. Cutaneous leishmaniasis in Switzerland: first experience with species-specific treatment. **Infection**, v. 41, n. 6, p. 1177-82, 2013.

MOURI, O. et al. Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n.6, p. e2841, 2014.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar americana nas Américas. **Revista Percurso – NEMO**, v. 1, p. 85-103, 2009.

NUCKOLS, J. R.; WARD, M. H.; JARUP L. Using geographic information systems for exposure assessment in environmental epidemiology studies. **Environ. Health Perspect.**, v. 112, n. 9, p. 1007–15, 2004.

NUNES, W. S.; ARAÚJO, S. R.; CALHEIROS, C. M. Epidemiological profile of leishmaniasis at a reference service in the state of Alagoas, Brazil, from January 2000 to September 2008. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 14, p. 342-5, 2010.

OLIVEIRA, F. S. et al. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. **Parasit. Vectors**, v. 6, n. 1, p. 189, 2013.

OLIVEIRA NETO, M. P. et al. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani chagasi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 3, p. 303–9, 1986.

OLIVEIRA NETO, M. P. et al. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 80, n. 6, p. 587–92, 1986.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. et al. Clinical and laboratory profiles of patients with early spontaneous healing in cutaneous localized leishmaniasis: a historical cohort study. **BMC Infect. Dis.**, v. 17, p. 559, 2017.

ONDRISKA, F. et al. Imported new world cutaneous leishmaniasis in a traveller from Slovakia. **Bratisl. Lek. Listy.**, v. 116, n. 3, p. 203-6, 2015.

ORÉ, M. et al. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in peruvian military personnel undertaking training activities in the Amazon Basin, 2010. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, n. 2, p. 340–6, 2015.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses. Informe epidemiológico das Américas.** Informe de Leishmanioses no 8, Dezembro de 2019. Disponível em: [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/51738/leishreport8\\_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y) Citado em 11 de fevereiro de 2020.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. Leishmaniasis: Fact sheet for health workers. Report. [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13648:leishmaniasis-fact-sheet-health-workers&Itemid=40721&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13648:leishmaniasis-fact-sheet-health-workers&Itemid=40721&lang=en) Citado em 20 de fevereiro de 2020.

PACHECO, R. S. et al. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. **Parasitology**, v. 100, n. Pt 3, p. 393–8, 1990.

PACHECO, R. S. et al. **Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques.** In: *Leishmania Taxonomie et Phylogenesse Application Eco-Epidemiologique*. Montpellier; p. 57–65, 1986.

PATINO, L.H. et al. Spatial distribution, *Leishmania* species and clinical traits of cutaneous leishmaniasis cases in the Colombian army. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 8, p. e0005876, 2017.

PAU M. et al. Two cases of primary endonasal leishmaniasis in Sardinia (Italy). **Dermatol. Online J.**, v. 15, n. 6, p. 5, 2009.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 14, p. e1032–e1039, 2010.

PEDROSA, F, A.; XIMENES, R. A. Sociodemographic and environmental risk factors for American cutaneous leishmaniasis (ACL) in the State of Alagoas, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 2, p. 195-201, 2009.

PÉREZ-AYALA, A. et al. Imported leishmaniasis: A heterogeneous group of diseases. **J. Travel Med.**, v. 16, n. 6, p. 395–401, 2009.

PESSÔA, S.; BARRETO, M. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Rio de Janeiro; Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação; 1948.

PIMENTEL, M. I. F. et al. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 2, p. 254 – 6, 2011.

PIRES, M. Q. et al. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, n.2, p. 243–6, 2014.

PLOURDE M. et al. Genetic polymorphisms and drug susceptibility in four isolates of *Leishmania tropica* obtained from Canadian soldiers returning from Afghanistan. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 1, p. e1463, 2012.

POEPPL, W. et al. Clinical findings and management of imported cutaneous leishmaniasis: Report of 14 cases from Austria. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 11, p.90-4, 2013.

POEPPL, W. et al. Short Report: Cutaneous leishmaniasis after travel to Cyprus and successful treatment with miltefosine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 4, p. 562–5, 2011.

PREEDY, H. C.; BAILEY, M. S. Leishmaniasis and its relevance to UK Armed Forces. **J. R. Nav. Med. Serv.**, v. 100, n. 3, p. 238-43, 2014.

PIRMEZ, C. et al. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.6, p.1819-23. 1999.

Quantum GIS (QGIS). [https://qgis.org/pt\\_BR/site/](https://qgis.org/pt_BR/site/) Acesso em 20/02/2020.

QUINTELLA, L. P. et al. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 51, n. 2, p. 83-6, 2009.

RAGHUNATH, R. S. et al. Cutaneous leishmaniasis in a returning UK traveler. **Postgrad. Med. J.**, v. 90, n.1067, p. 540-1, 2014.

RAMOS, W. R., et al. Anthropic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in na Amazonian rural settlement, Brazil. **Acta Trop.**, v. 139, p. 44-52, 2014.

RAWLINS, S. C. et al. American cutaneous leishmaniasis in Guyana, South America. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 95, n. 3, p. 245-51, 2001.

RIBEIRO, A. I, et al. Tools for address georeferencing – limitations and opportunities every public health professional should be aware of. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114130, 2014.

ROBERTS, T. et al. Molecular epidemiology of imported cases of leishmaniasis in Australia from 2008 to 2014. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119212, 2015.

RODRIGUES, A. M. et al. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 2, p. 139 – 45, 2006.

ROGERS, D. J.; RANDOLPH, S. E. Studying the global distribution of infectious diseases using GIS and RS. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 1, n.3, p. 231–7, 2003.

ROMERO, G. A. et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 456– 65, 2001.

ROSA, M. E. A.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, immunological, and therapeutic aspects. **Drug Dev. Res.**, v. 72, p. 437-41, 2011.

ROTUREAU, B. et al. Leishmaniasis among gold miners, French Guiana. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 7, p. 1169-70, 2006.

RUSHTON, G. Public health, GIS, and spatial analytic tools. *Annu. Rev. Public Health*, v. 24, p 43–56, 2003.

SANCHEZ, J. L. et al. Epidemiologic investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 1, p. 47-54, 1992.

SAHEKI, M. N. et al. Low versus high dose of antimony for American cutaneous leishmaniasis: A randomized controlled blind non-inferiority trial in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0178592, 2017.

SALOMÓN, O. D. et al. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Iguazú falls area of Argentina. **Acta Trop.**, v. 109, n.1, p. 5-11, 2009.

SARANTOPOULOS, G. P. et al. Old World cutaneous leishmaniasis in Los Angeles: A case report, overview of the current literature, and guide for the treating dermatopathologist. **Am. J. Dermatopat.**, v. 25, n.4, p. 321–6, 2003.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 9, n. 6, p. 588 – 6, 2015.

SCARISBRICK, J. J. et al. Clinical features and diagnosis of 42 travellers with cutaneous leishmaniasis. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 4, n. 1, p. 14-21, 2006.

SCHLEUCHER, R. D. et al. Successful diagnosis and treatment 50 years after exposure: Is mucocutaneous leishmaniasis still a neglected differential diagnosis? **J. Travel Med.**, v. 15, n. 6, p. 466–467, 2008.

SCOPE, A. et al. Imported mucosal leishmaniasis in a traveler. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. e83–e87, 2003.

Secretaria de Estado de Saúde do Rio De Janeiro. Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses. **Boletim Epidemiológico Leishmanioses 002/2017. Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Rio de Janeiro – 01/01/2007 a 07/11/2017.** Disponível em: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=yxZJtrWIKVA%3D>  
Citado em 25 de janeiro de 2020.

SENNA, T. C. R. et al. Clinical features and therapeutic response in adult and pediatric patients with American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 114, p. 1-6, 2020.

SHIMABUKURO, P. H. F.; ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, v. 660, p. 67–106, 2017.

SHOWLER, A. J.; BOGGILD, A. K. Cutaneous leishmaniasis in travellers: a focus on epidemiology and treatment in 2015. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 17, n. 7, p. 489, 2015.

SIMON, S. et al. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: revising epidemiology with PCR-RFLP. **Trop. Med. Health**, v. 45, n. 1, 2017. Disponível em: <http://tropmedhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41182-017-0045-x> Citado em 26 de junho de 2018.

SILVA, A. E. P; GURGEL, H. C. Leishmaniose tegumentar americana e suas relações sócio ambientais no município de Ubatuba – SP. **Confins Rev. Franco-Bras. Geogr.**, v. 13, n. 13, p. 7348, 2011. Disponível em: <https://journals.openedition.org/confins/7348> Citado em 10 de fevereiro de 2020.

SILVA, A. C. T. et al. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Trop. Med. Int. Health**, v. 11, n. 9, p. 1388–98, 2006.

SILVA, L. A. et al. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, n. 1, p. 77–83, 2010.

SILVEIRA, F.T. et al. 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, n. 1, p. 43-50, 2002.

SILVA, N. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Brasil. **Rev. Saude Publica.**, v. 33, n. 6, p. 554-9, 1999.

SILVA, A. C. T. et al. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Trop. Med. Int. Health**, v. 11, n. 9., p. 1388-98, 2006.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 99, p. 239-51, 2004.

SOARES, L.; ABAD-FRANCH. F.; FERRAZ G. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Central Amazonia: a comparison of sex-biased incidence among rural settlers and field biologists. **Trop. Med. Internat. Health**, v. 19, n. 8, p. 9888-95, 2014.

SOLOMON, M. et al. Tropical skin infections among Israeli travelers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, n. 5, p. 868–872, 2011.

SOLOMON, M.; SCHWARTZ, E. [CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN ISRAEL 2016—AN UPDATE]. **Harefuah**, v. 155, n. 10, p. 626–31, 2016.

SOLOMON, M., et al. Mucosal leishmaniasis in travelers with *Leishmania braziliensis* complex returning to Israel. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 25, n. 4, p. 642-8, 2019.

SOSA-ESTANI, S. et al. Leishmaniose cutânea no Norte da Argentina. Fatores de risco identificados num estudo caso-coorte em três municípios de Salta. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 6, p. 511-517, 2001.

SOTIROPOULOS, G.; WILBUR, B. Two cases of cutaneous leishmaniasis presenting to the Emergency Department as chronic ulcers. **J. Emerg. Med.**, v. 20, n. 4, p. 353–356, 2001.

SOTO, J.; SOTO, P. Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. **Biomédica**, v. 26, n. suppl 1, p. 194 – 206, 2006.

SOUZA, N. A. et al. The Phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two Atlantic rain forest reserves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 319 – 24, 2001.

STEWARTSON, A. J. et al. Two cases of Old World cutaneous leishmaniasis in Australian travelers visiting Morocco. **J. Travel Med.**, v. 17, n. 4, p. 278–80, 2010.

STIENLAUF, S. et al. Epidemiology of travel-related hospitalization. **J. Travel Med.**, v. 12, p.136–41, 2005.

TEDESQUI, V. L. et al. Active surveillance of American tegumentary leishmaniasis in endemic areas in rural Bolivia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 1, p. 30-4, 2012.

TELES, C. B. et al. Molecular characterization of American cutaneous leishmaniasis in the tri- border area of Assis Brasil, Acre state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 57, n. 4, p. 343-7, 2015.

TEMPONI, A. O. D. et al. Ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar americana: uma análise multivariada dos circuitos espaciais de produção, Minas Gerais, Brasil, 2007 a 2011. **Cad. Saude Publica**, v. 34, n. 2, p. e00165716, 2018.

VAN DER AUWERA, G.; DUJARDIN J.-C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 28, n. 2, p. 265–94, 2015.

VAN DER SNOEK, E. M. et al. Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 34, n. 8, p. e889-91, 2009.

VAN DER SNOEK E. M. et al. Two cases of cutaneous leishmaniasis in Dutch military personnel treated with oral miltefosine. **J. R. Army Med. Corps.**, v. ; v. 163, n. 1, p. 68-70, 2017.

VAN THIEL, P. P. et al. Cutaneous leishmaniasis (*Leishmania major* infection) in dutch troops deployed in Northern Afghanistan: Epidemiology, clinical aspects, and treatment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 6, p. 1295–300, 2010a.

VAN THIEL, P. P. A. M. et al. Miltefosine treatment of *Leishmania major* infection: An observational study involving Dutch military personnel returning from Northern Afghanistan. **Clin. Infect. Dis.**, v. 50, p. 80 – 83, 2010b.

VAN THIEL, P. P. A. M. et al. Cutaneous leishmaniasis in three Dutch military cohorts following jungle training in Belize. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 9, p.153e160, 2011.

VANBRABANT, P.; VAN DEN BROUCKE, S.; SOENTJENS, P. Cutaneous ulcer after a stay in the tropics. **Neth. J. Med.**, v. 73, n. 1, p. 44 - 9, 2015.

VASCONCELLOS, E. C. F. et al. Short report: Intralesional meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis. Patients with contraindication to systemic therapy from Rio de Janeiro (2000 to 2006). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, p. 2, p. 257 -60, 2012.

VELEZ, I. D. et al. Gender and cutaneous leishmaniasis in Colombia. **Cad. Saude Publica**, v. 17, n. 1, p. 171–80, 2001.

VICKERY, J. P. et al. Factors associated with the use of protective measures against vector-borne diseases among troops deployed to Iraq and Afghanistan. **Mil. Med.**, v. 173, n.11, p. 1060-7, 2008.

VIEIRA C. P. et al. Temporal, spatial and spatiotemporal analysis of the occurrence of visceral leishmaniasis in humans in the City of Birigui, State of São Paulo, from 1999 to 2012. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, n. 3, p. 350–8, 2014.

VINETZ, J. M.; SOONG, L. *Leishmania mexicana* of the eyelid in a traveler to Belize. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 11, n. 1, p.149-52, 2007.

WEIGEL, M. M. et al. Cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador: popular perceptions, knowledge, and treatment. **Bull. Pan Am. Health Organ.**, v. 28, n. 2, p.142-55, 1994.

WEIGLE, K. A. et al. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: Environmental and behavioral risk factors for infection, clinical manifestations, and pathogenicity. **J. Infect. Dis.**, v. 168, n. 3, p. 709–14, 1993.

WEINA P. J. et al. Old World leishmaniasis: An emerging infection among deployed US military and civilian workers. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. 1674–80, 2004.

WILLARD, R. J. et al. Cutaneous leishmaniasis in soldiers from Fort Campbell, Kentucky returning from Operation Iraqi Freedom highlights diagnostic and therapeutic options. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, n. 6, p. 9779-87, 2005.

WILLEMS, J.P.; SCHMIDT, S.M.; GREER, K.E.; MCCALL, C.O., et al. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis in a traveler. **South Med. J.**, 1997, v. 90, n. 3, p. 325-327.

WISE, E. S. et al. Monitoring toxicity associated with parenteral sodium stibogluconate in the day-case management of returned travellers with New World cutaneous leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 6, p. e1688, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Technical Report Series 949. Control of the leishmaniasis.** Geneva, 2010, 186 p. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf) Acesso em 28/12/15.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance** Geneva: WHO; 2017, v. 38, p. 557–572. Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/who\\_wer9238/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_wer9238/en/) Acesso em 06/07/2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Status de endemidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2016.** Disponível em: [https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status\\_of\\_endemicity\\_of\\_CL\\_worldwide\\_2016\\_with\\_imported\\_cases.pdf?ua=1](https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf?ua=1) Acesso em 06/07/2019.

WORTMANN, G. et al. A randomized, double-blind study of the efficacy of a 10- or 20-day course of Sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 261–7, 2002.

WRIGHT, N. A. et al. Cutaneous leishmaniasis in Texas: A northern spread of endemic areas. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 58, n. 4, p. 650-2, 2008.

ZANGER, P. et al. Case report: Successful treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopica* with liposomal amphotericin B in an immunocompromised traveler returning from Eritrea. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 5, p. 692–4, 2011.

ZAGHI, D. et al. New World cutaneous leishmaniasis: current challenges in diagnosis and parenteral treatment. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 64, n. 3, p. 587-92, 2011.

## ANEXO I

### PARECER CONSOLIDADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INI/Fiocruz

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Leishmaniose cutânea como doença laboral e do viajante: pacientes atendidos em centro de referência no Rio de Janeiro entre 2000 e 2015

**Pesquisador:** Maria Inês Fernandes Pimentel

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 61114116.4.0000.5262

**Instituição Proponente:** INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

**Patrocinador Principal:** Fundação Oswaldo Cruz

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.829.451

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma coorte retrospectiva com a finalidade de estudar a ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) de acordo com a atividade profissional e deslocamentos realizados pelos pacientes atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LapClin VigilLeish), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), entre 2000 e 2015. Serão incluídos pacientes com LC atendidos no LapClin Vigileish do INI/Fiocruz entre 2000 e 2015, independentemente de gênero e idade, que tenham assinado termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do "Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana no Centro de Referência em LTA – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz". No caso de menores de 18 anos, aqueles cujos pais ou responsáveis assinaram o TCLE do referido estudo. Serão excluídos os pacientes com leishmaniose mucosa ou cutaneomucosa no momento do diagnóstico. Os pacientes que adquiriram LC como consequência de residirem no RJ serão comparados com aqueles que adquiriram a doença devido à residência ou ao deslocamento geográfico em áreas endêmicas fora do RJ, principalmente quanto às formas clínicas e resposta terapêutica, bem como com relação aos motivos que levaram ao deslocamento para uma área endêmica de LC. Os pesquisadores esperam verificar o comportamento da LTA como enfermidade relacionada à Saúde do Trabalhador e sob a

**Endereço:** Avenida Brasil 4365

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3865-9585

**E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.829.451

ótica da Medicina do Viajante para atualização de protocolos e novas abordagens epidemiológicas de controle.

**Objetivo da Pesquisa:**

A presente pesquisa tem como objetivo estudar os casos de Leishmaniose Cutânea (LC) diagnosticados no Lapclin Vigileish do INI/Fiocruz, entre 2000 e 2015, sob a ótica da enfermidade como doença laboral e da Medicina do Viajante. Os objetivos específicos são: descrever os pacientes com LC adquirida segundo local de transmissão, gênero, faixa etária e profissão; relacionar a atividade laboral ou de vida com a possibilidade de desenvolvimento de LC nos casos adquiridos no estado do RJ, em outras unidades da Federação ou fora do país; estudar a LC adquirida em decorrência de deslocamentos por motivos como viagens a trabalho ou lazer, ecoturismo, movimentos migratórios e outros, comparar a evolução clínica e resposta aos tratamentos específicos dos pacientes com LC adquirida por motivo de residência em área endêmica no RJ com aquela adquirida fora do RJ, e estudar especificamente os casos de LC adquiridas por militares devido ao deslocamento para áreas endêmicas no exercício da profissão em relação às formas clínicas e resposta aos tratamentos específicos no âmbito do LapClin Vigileish.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Por se tratar de um estudo retrospectivo, o risco envolvido é o da confidencialidade dos dados. A pesquisadora e a aluna se comprometerão a manter a confidencialidade através da assinatura de um termo de compromisso e responsabilidade. O benefício para os participantes do estudo será indireto, através do melhor conhecimento dos fatores que influenciam o adoecimento com LTA para indivíduos que se deslocam em situações de trabalho, lazer ou outros motivos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo relevante sobre o tratamento de uma doença negligenciada importante no Brasil. Será executado por equipe experiente no acompanhamento de casos de LTA.

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

Os Termos de Apresentação Obrigatória estão adequados.

**Recomendações:**

Não se aplica.

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

Aprovado.

Endereço: Avenida Brasil 4365  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.829.451

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_764359.pdf	29/07/2016 11:15:53		Aceito
Outros	TermoComprResp_AssinadoEscaneado.docx	29/07/2016 11:14:55	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PedidoDispensaTCLE_AssinadoEscaneado.docx	29/07/2016 11:02:12	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutoradoMariza20jul16.docx	29/07/2016 11:00:44	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostoAssinadaEscaneada.docx	29/07/2016 10:59:10	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 18 de Novembro de 2016

**Assinado por:**  
**Léa Ferreira Camillo Coura**  
**(Coordenador)**

Dr<sup>a</sup> Léa Ferreira Camillo Coura  
Coordenadora do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
Mat. SIAPE 003709620  
IPEC / FIOCRUZ

**Endereço:** Avenida Brasil 4365  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3865-9585 **E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

## **ANEXO II**

### **TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE**

Nós, Mariza de Matos Salgueiro, aluna de doutorado, Maria Inês Fernandes Pimentel, orientadora, e Sandro Javier Bedoya Pacheco, orientador do projeto de pesquisa intitulado “Leishmaniose cutânea como doença laboral e do viajante: pacientes atendidos em centro de referência no Rio de Janeiro entre 2000 e 2015”, comprometemo-nos a manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

A identidade dos participantes, assim como os resultados obtidos com este projeto serão mantidos em um banco de dados sob a responsabilidade dos orientadores.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro, 01 de março de 2016.

---

Mariza de Matos Salgueiro

---

Maria Inês Fernandes Pimentel

---

Sandro Javier Bedoya Pacheco