

**A AVALIAÇÃO LONGITUNIDAL DA INCIDÊNCIA DA LEISHMANIOSE
DISSEMINADA NO BAIXO SUL DA BAHIA E A DISSEMINAÇÃO DO
GENÓTIPO PARASITÁRIO ENTRE LESÕES ORIGINAIS E METASTÁTICAS
DOS PACIENTES**

I. RESUMO

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o principal agente responsável pela Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e apresenta um alto grau de polimorfismo genético, o que está relacionado ao surgimento de formas clínicas emergentes da doença. Determinados alelos localizados no locus que se inicia na posição 425.451 do cromossomo 28 (*locus* CHR28/425451) da *L. braziliensis* estão associados à leishmaniose cutânea disseminada (LD). O objetivo deste estudo é avaliar os genótipos de *L. braziliensis* presentes nas lesões primárias e secundárias de pacientes diagnosticados com Leishmaniose Disseminada (LD), além de caracterizar a endemia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) na região de Corte de Pedra. Buscaremos comparar os genótipos parasitários nas lesões primárias e secundárias desses pacientes, assim como verificar se o genótipo do parasita em pacientes com mais de 50 lesões é o mesmo encontrado em pacientes com menos de 50 lesões. Além disso, o estudo avaliará a incidência de casos de leishmaniose nas formas cutâneas e disseminadas na área endêmica de Corte de Pedra, abrangendo o período de 2012 a 2022. Também será feita uma descrição das características demográficas dos pacientes diagnosticados com leishmaniose tegumentar na mesma região durante esse período. O presente estudo caracteriza-se como um corte transversal, incluindo um total de 55 pacientes diagnosticados com LD. A partir do DNA extraído das biópsias das lesões desses pacientes, a espécie infectante foi confirmada como *L. braziliensis* por PCR em tempo real em toda a amostra e foi realizada a genotipagem por clonagem e sequenciamento do tipo Sanger do locus CHR 28/425451, para se identificar a presença de polimorfismos. Esta amostra foi coletada entre março de 2017 e março de 2019, em moradores de Corte de Pedra-BA. Os dados revelam que o sexo masculino apresentou o maior número de casos. Quando analisamos a idade dos pacientes, observamos que as mulheres têm uma média de 42,7 anos, em comparação com 38 anos dos homens; no entanto, essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa. Além disso, constatamos que a maioria dos pacientes possui menos de 50 lesões. Por fim, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas nas proporções ou resultados entre os grupos CCT e TT. Em adição foi avaliamos a incidência de casos de leishmaniose na área endêmica de Corte de Pedra entre 2012 até 2022.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose Tegumentar Americana; 2. Leishmaniose Disseminada; 3. *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Tabela 1. Composição da amostra do estudo.

	Masculino	Feminino	<i>p</i> valor
Paciente	46	9	
Número de lesões			
≤ 50	32	7	0,6169 [#]
> 50	14	2	
Idade: Média (desvio padrão)	38 (±15,52) *	42,7 (±13,90) *	0,3963 ^{&}

Teste estatístico aplicado: # teste qui-quadrado; & Mann-Whitney

A amostra foi composta por nove são mulheres e 46 são homens. Em relação a idade, as mulheres tiveram a média de 42,7 anos e os homens de 38 anos, porém não houve diferença estatisticamente significativa. Em adição foi possível verificar que a quantidade de lesões na maioria nos pacientes foi inferior a 50 lesões.

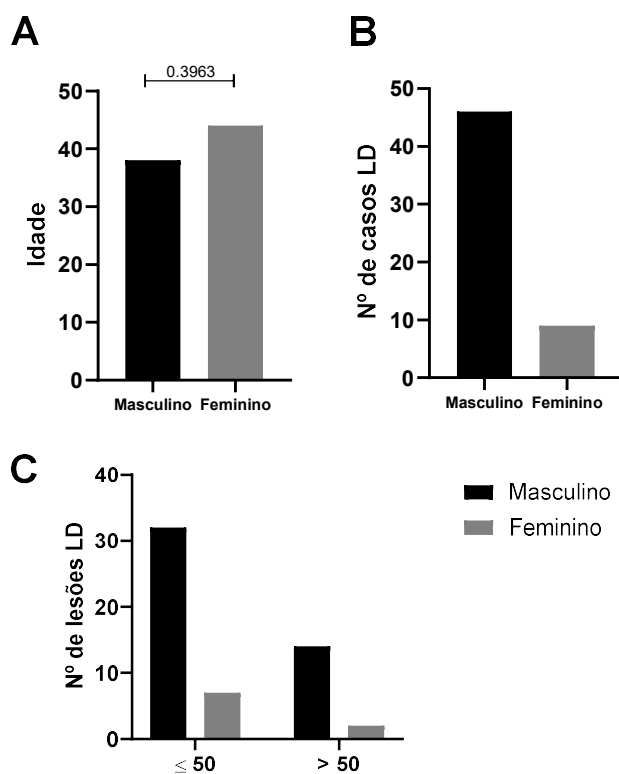


Figura 3. Composição da amostra do estudo. A) Média etária dos participantes. B) Número de casos de LD entre homens e mulheres. C) Número de lesões (<50 e >50 entre homens e mulheres). O teste estatístico aplicado foi Mann-Whitney.

Amostras obtidas por biópsia cutânea de úlceras e pápulas de 22 dos 55 pacientes de LD recrutados para o estudo (i.e., uma úlcera e uma pápula por paciente) tiveram o DNA total (i.e., DNA humano somado ao parasitário) extraído, e o locus CHR28/425451 da *L. (V) braziliensis* amplificado por PCR e sequenciado pelo método de Sanger. As genotipagens levaram em consideração as posições polimórficas 30, 286 e 545 do locus CHR28/425451, evidenciando a presença dos haplótipos polimórficos CCT e TT- nos parasitas presentes nesses pacientes de LD.

Tabela 2. Achados de haplótipos entre Pápula e Úlcera

	Pápula	Úlcera	Total	p valor
CCT	26 (48,15%)	28 (51,85%)	54	0,7223
TT -	8 (53,33%)	7 (46,67%)	15	

As genotipagens revelaram que os isolados de *L. braziliensis* apresentaram os haplótipos CCT e TT- no locus CHR28/425451. Não foi observada uma diferença estatisticamente significativa nas proporções CCT e TT- encontradas entre úlceras e pápulas indicando, que em geral, a mesma cepa parasitária estava presente nas lesões ulceradas originais e nas lesões disseminadas.

O alinhamento das sequências obtidas para o locus CHR28/425451 entre as *L. braziliensis* dos participantes do estudo exemplificado na figura 4 revela as substituições de citosinas (i.e., “C”) por timinas (i.e., “T”) na posição polimórfica 286 daquele locus: parasitas com haplótipo CCT apresentarão “C” na posição 286 evidenciada nessa figura; parasitas TT- apresentarão “T” na posição 286.

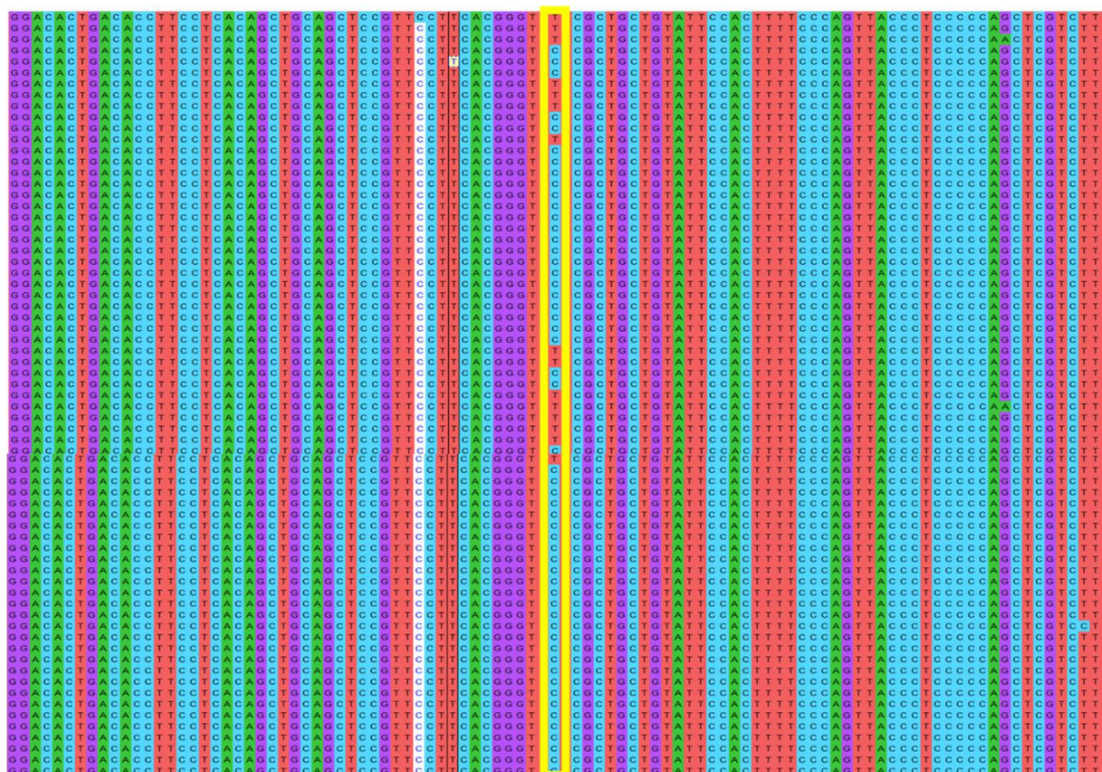


Figura 4. Alinhamento das sequências de nucleotídeos do *locus* CHR 28/42545122 dos isolados de *L. (V) braziliensis* de 22 pacientes com leishmaniose Disseminada de Corte de Pedra/BA. A posição destacada é a 286 do *locus* CHR 28/425451.

A figura 5 mostra a variação ao longo do tempo de aproximadamente 6.000 pacientes atendidos no PSDJMC entre 2012 e 2022. Levando em consideração apenas os dados da figura, fica evidente que a frequência de diagnósticos de LTA no posto apresenta grande flutuação ao longo do tempo, com períodos de maior ou menor quantidade de pacientes. O ano de 2012 chama particular atenção no fragmento avaliado porque o total de pacientes com LTA diagnosticados ($n=1.747$) se mostrou cerca de 4 vezes maior do que a média de casos dos demais anos (i.e., 2013 a 2022, $n=425$). Se essa discrepância não estiver refletindo uma pulverização do diagnóstico da LTA na região para outros postos de saúde nos anos subsequentes a 2012, aquele achado indica que um grande surto de LTA ocorreu no Baixo Sul naquele ano. Mesmo levando-se em consideração apenas os anos de 2013 a 2022, é possível perceber uma flutuação no diagnóstico da LTA no

posto de Corte de Pedra. Os anos de 2013, 2017 e 2018 apresentaram uma média anual de 701 casos, ao passo que os demais anos apresentaram aproximadamente metade do número de diagnósticos com a média de 307 casos por ano.

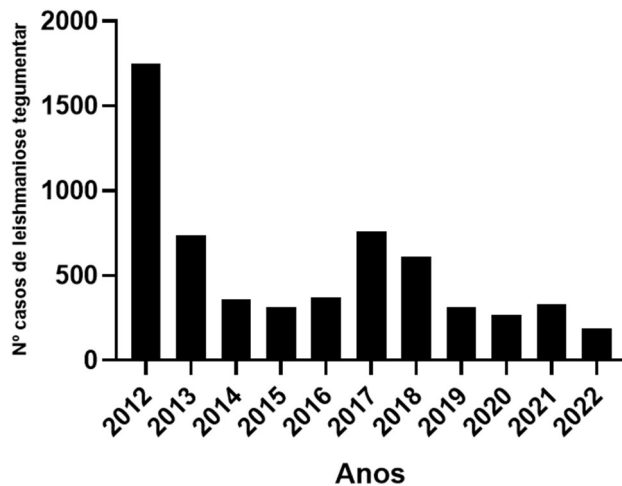


Figura 5. Total de pacientes atendidos no PSDMJC entre 2012 e 2022.

A distribuição por idade dos pacientes atendidos no PSDJMC (Figura 6), evidencia que os indivíduos com idades entre 11 e 20 anos (23.3%), seguidos por aqueles entre 21 e 30 anos (19.5%), correspondem aos extratos etários mais afetados na amostra, totalizando 2.571 diagnósticos de LTA. De fato, pacientes em suas quatro primeiras décadas de vida correspondem a 73% (n= 4.386) dos casos de LTA (n=6.002) diagnosticados naquele posto de saúde no período avaliado.

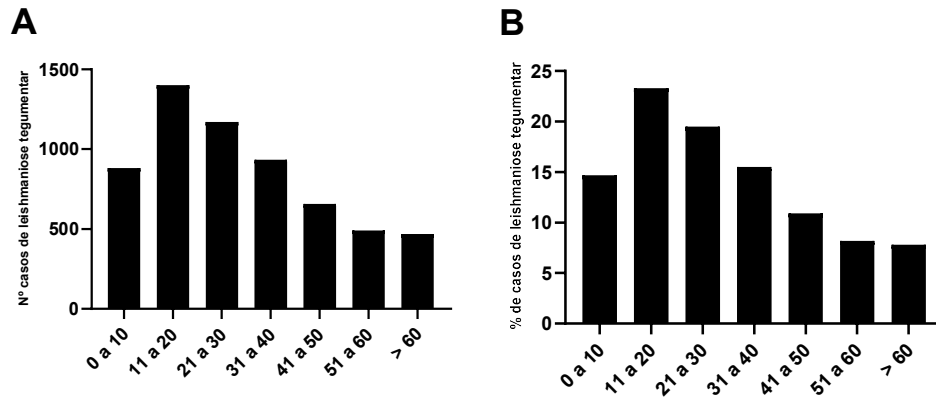


Figura 6. Idade dos pacientes atendidos entre 2012 e 2022. A) Número de Casos de LTA. B) Frequência de casos de LTA.

Em relação à distribuição por gênero (Figura 7), observa-se que, entre 2012 e 2022, 60.9% dos diagnósticos de LTA no PSDJMC corresponderam a homens, enquanto 39.1% foram mulheres, corroborando dados previamente publicados (Silva et al., 2017) para essa e outras áreas endêmicas para LTA.

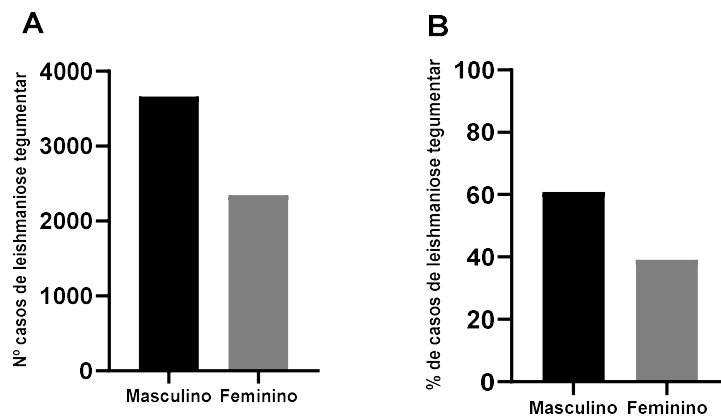


Figura 7. Número de pacientes atendidos no PSDMJC entre 2012 e 2022 estratificados por gênero. A) Número de casos LTA por gênero. B) Percentual de número de casos por gênero.

Buscando uma compreensão mais ampla da flutuação da endemia de LTA no Baixo Sul da Bahia detectada pelos diagnósticos realizados no PSDJMC, expandimos a avaliação acima para refletir o período de 1999 a 2022, incorporando dados previamente publicados que se estendiam de 1999 a 2011 (Silva et al., 2017). A análise consolidada mostrada na figura 8 revela que nos cinco anos entre 2008 e 2012 houve um aumento marcado no número de diagnósticos de LTA naquele posto (n=6.403), consistindo em 47% de todos os casos diagnosticados na série de 23 anos em estudo (n=13.599). É importante salientar que no estudo progresso que envolveu de 1999 a 2011, não havíamos incluído os anos de 2004 a 2007. Embora, não tenhamos formalmente testado a correlação entre tempo e número de casos de LTA diagnosticados, parece haver uma queda progressiva no número de diagnósticos naquele posto nos anos mais recentes. O número médio de diagnósticos de LTA nos anos apresentados na figura 8 que precederam o pico de 2008 a 2012 foi de 608 casos, dobrando para 1.280 entre 2008 e 2012, e caindo para 425 diagnósticos de LTA por ano entre 2013 e 2022.

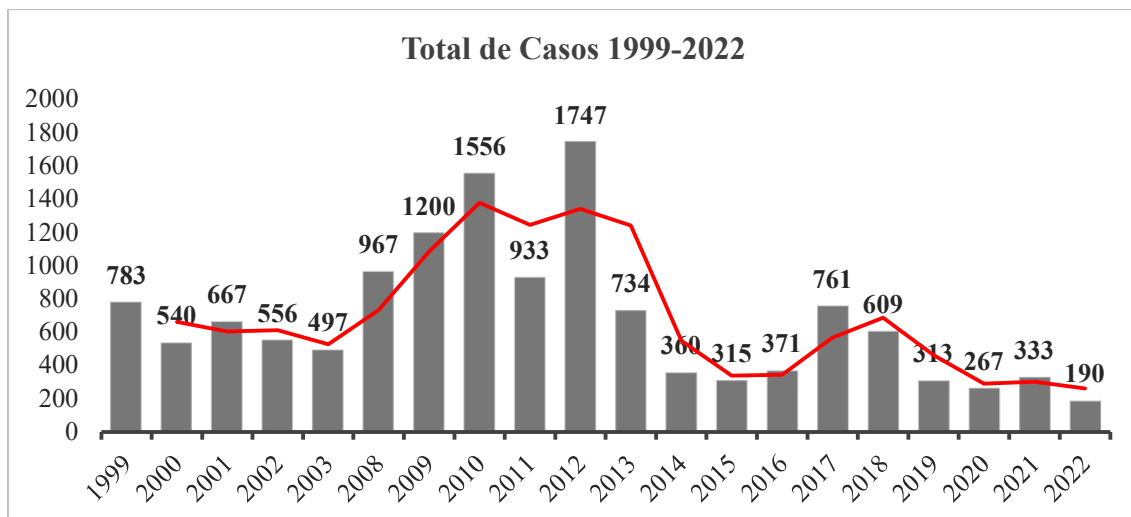


Figura 8. Evolução dos diagnósticos de Leishmaniose Tegumentar Americana no PSDMJC entre 1999 e 2022.

É importante destacar que houve diferença aparente nas flutuações dos diagnósticos das diferentes formas de LTA no PSDJMC (Figura 9). É observado que a forma cutânea é mais prevalente que as formas mucosa e disseminada no decorrer dos anos analisados.

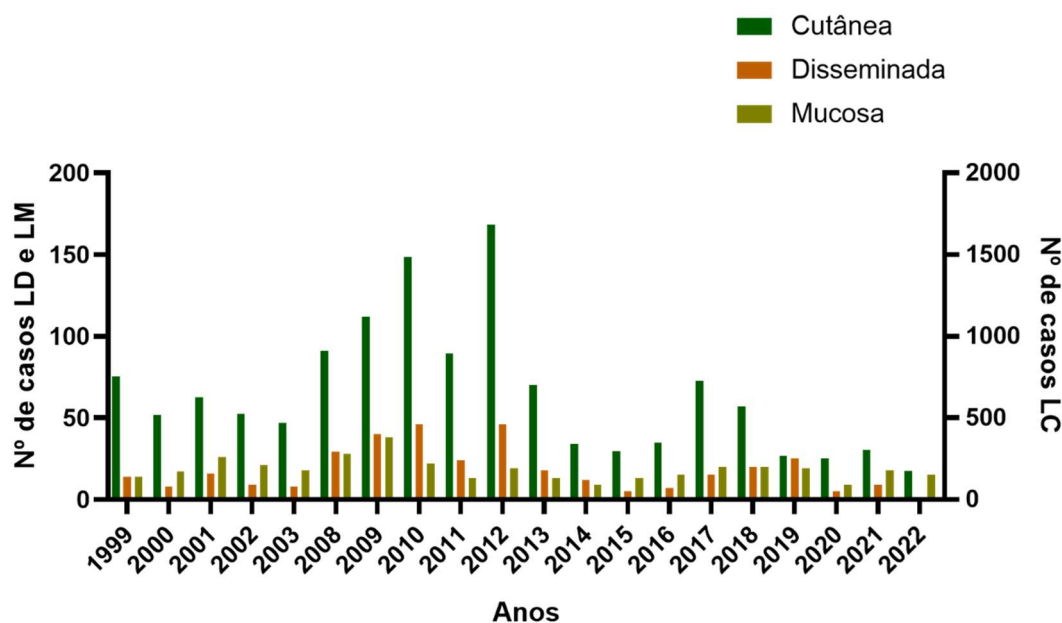


Figura 9. Acompanhamento de casos de LTA nas três formas clínicas (LC, LM e LD) entre 1999 e 2022.

Embora, a LC seja mais prevalente, ela apresenta correlações positivas significativas com LM ($r=0,5108$; $p=0,0214$) e LD ($r=0,8005$; $p<0,0001$). Além disso, LM e LD também apresentaram uma correlação moderadamente positiva ($r=0,5659$; $p=0,0093$) no período (Figura 10 A, B e C).

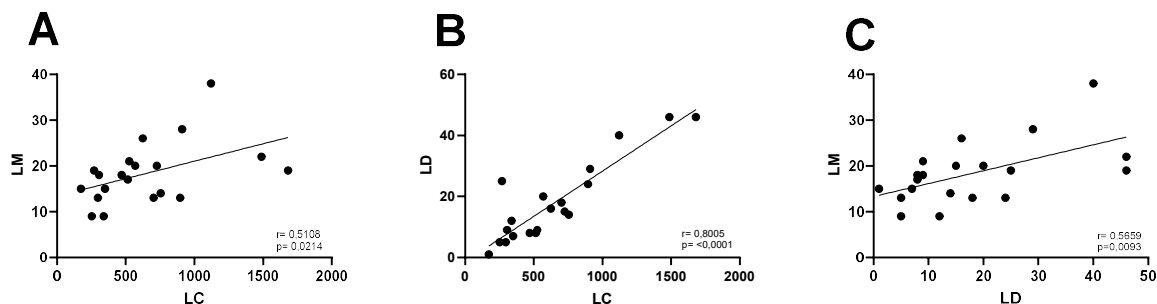


Figura 10. Correlação entre as frequências dos diagnósticos das formas clínicas de LTA no PSDMJC. **A)** Correlação entre leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose cutânea (LC). **B)** Correlação entre leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose cutânea (LC). **C)** Correlação entre leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD). O teste estatístico aplicado foi o coeficiente de correlação de Spearman.

Para avaliar a validade externa dos nossos achados referentes à oscilação da endemia de LTA no Baixo Sul da Bahia baseada na flutuação de diagnósticos em Corte de Pedra, avaliamos a distribuição entre os dados de notificação de LTA para o município Presidente Tancredo Neves, onde fica sediado o posto, e de diagnósticos de LTA no PSDJMC. Os dados de notificação para LTA entre 1999 e 2022 listados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) e na DIVEP/SESAB (Diretoria de Vigilância Epidemiológica/ Secretaria de Saúde do Estado da Bahia) estão dispostos na figura 11. É digno de nota que há um hiato de três anos (2004, 2005 e 2006) tanto no SINAN quanto nos dados da DIVEP.

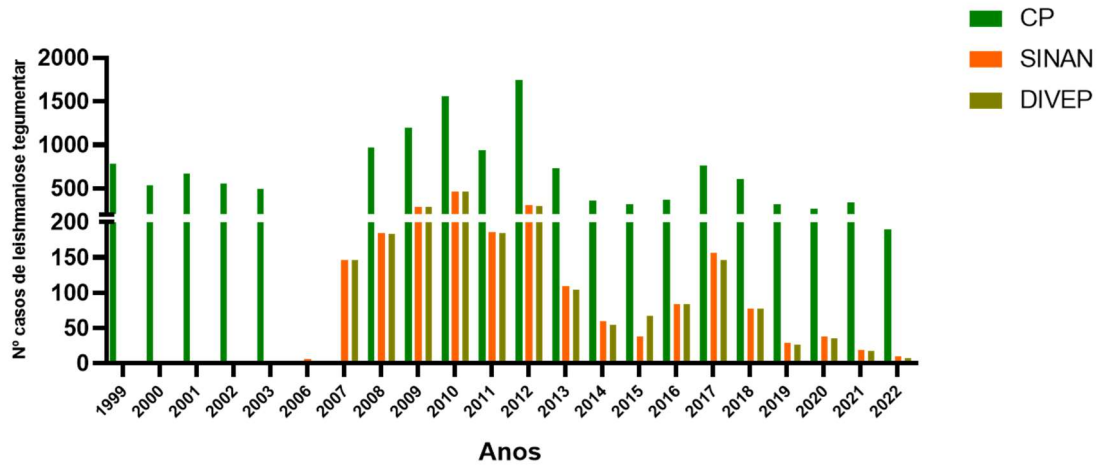


Figura11. Comparativo do número de Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnosticados no PSDMJC e o número de notificações registradas pela DIVEP e SINAN no Município de Presidente Tancredo Neves entre 2002 e 2022.

A simples impressão visual passada pela figura 12 sugere ampla sobreposição com tudo o que foi descrito acima para o PSDJMC. Essa impressão é confirmada pelas correlações positivas altamente significativas entre os dados de diagnóstico de LTA naquele posto de saúde e os depositados nos bancos de notificação do SINAN e DIVEP (Figuras 12 A, B e C).

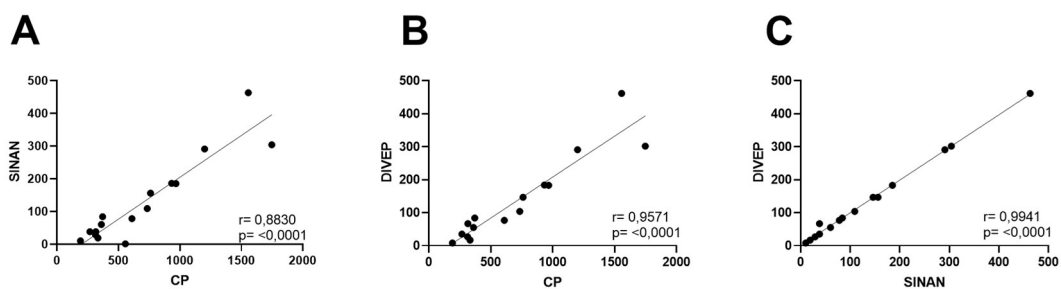


Figura 12. Correlação entre o número de Casos de LTA diagnosticados no PSDJMC e notificados no Município de Presidente Tancredo Neves entre 1999 e 2022. **A)** Correlação SINAN versus CP. **B)** Correlação DIVEP versus CP. **C)** Correlação DIVEP versus SINAN. O teste estatístico aplicado foi o coeficiente de correlação de Spearman.

**THE LONGITUDINAL ASSESSMENT OF THE INCIDENCE OF
DISSEMINATED LEISHMANIASIS IN THE SOUTHERN REGION OF BAHIA
AND THE DISSEMINATION OF THE PARASITIC GENOTYPE BETWEEN
ORIGINAL AND METASTATIC LESIONS IN PATIENTS.**

I. RESUMO

Leishmania (Viannia) braziliensis is the main agent responsible for American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) and exhibits a high degree of genetic polymorphism, which is related to the emergence of new clinical forms of the disease. Certain alleles located in the locus that starts at position 425,451 on chromosome 28 (locus CHR28/425451) of *L. braziliensis* are associated with disseminated cutaneous leishmaniasis (DCL). The objective of this study is to evaluate the genotypes of *L. (V.) braziliensis* present in the primary and secondary lesions of patients diagnosed with Disseminated Leishmaniasis (DL), as well as to characterize the endemicity of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the region of Corte de Pedra. We will compare the parasitic genotypes in the primary and secondary lesions of these patients, as well as verify whether the parasite genotype in patients with more than 50 lesions is the same as that found in patients with fewer than 50 lesions. Additionally, the study will evaluate the incidence of cases of leishmaniasis in its cutaneous and disseminated forms in the endemic area of Corte de Pedra, covering the period from 2012 to 2022. A description of the demographic characteristics of patients diagnosed with cutaneous leishmaniasis in the same region during this period will also be provided. This study is characterized as a cross-sectional analysis, including a total of 55 patients diagnosed with leishmaniasis. Using DNA extracted from biopsies of the lesions of these patients, the infecting species was confirmed as *L. braziliensis* by real-time PCR across the entire sample, and genotyping was performed through cloning and Sanger sequencing of the CHR 28/425451 locus to identify the presence of polymorphisms. This sample was collected between March 2017 and March 2019 from residents of Corte de Pedra, BA. The data reveal that the male sex showed a higher number of cases. When analyzing the age of the patients, we observed that women have an average age of 42.7 years, compared to 38 years for men; however, this difference was not statistically significant. Additionally, we found that most patients have fewer than 50 lesions. Finally, no statistically significant differences were identified in the proportions or outcomes between the CCT and TT groups. Furthermore, we evaluated the incidence of leishmaniasis cases in the endemic area of Corte de Pedra from 2012 to 2022.

Keywords: 1. American Cutaneous Leishmaniasis; 2. Disseminated Leishmaniasis; 3. *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Table 1. Sample Composition of the Study.

	Masculino	Feminino	<i>p</i> valor
Paciente	46	9	
Número de lesões			
≤ 50	32	7	0,6169 [#]
> 50	14	2	
Idade: Média (desvio padrão)	38 (±15,52) *	42,7 (±13,90) *	0,3963 ^{&}

Teste estatístico aplicado: # teste qui-quadrado; & Mann-Whitney

The sample consisted of nine women and 46 men. Regarding age, the women had an average of 42.7 years, while the men had an average of 38 years; however, there was no statistically significant difference. Additionally, it was possible to verify that the majority of patients had fewer than 50 lesions.

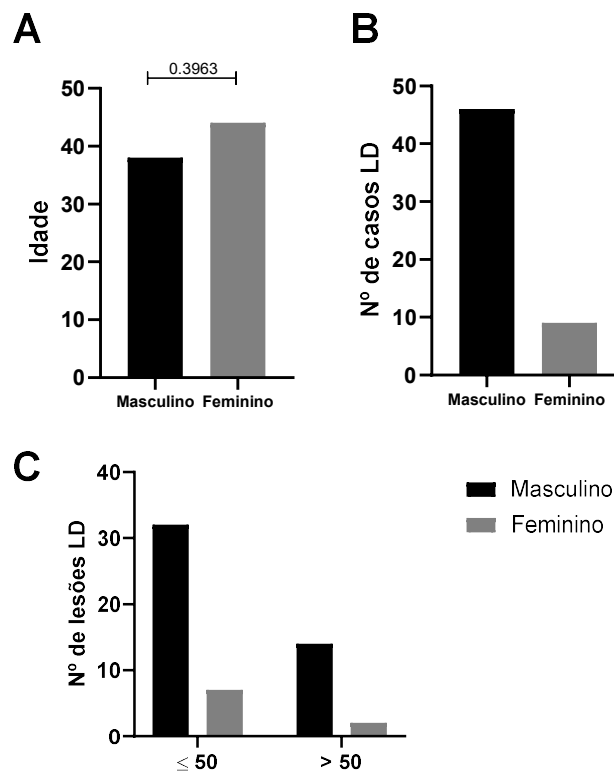


Figure 3. Composition of the study sample. A) Age mean of the participants. B) Number of LD cases among men and women. C) Number of injuries (50 among men and women). The statistical test applied was Mann-Whitney.

Samples obtained from skin biopsies of ulcers and papules from 22 of the 55 patients with cutaneous leishmaniasis (i.e., one ulcer and one papule per patient) had total DNA (i.e., human DNA combined with parasitic DNA) extracted, and the CHR28/425451 locus of *L. (V) braziliensis* was amplified by PCR and sequenced using the Sanger method. The genotyping took into account the polymorphic positions 30, 286, and 545 of the CHR28/425451 locus, highlighting the presence of the polymorphic haplotypes CCT and TT- in the parasites present in these cutaneous leishmaniasis patients.

Table 2. Haplotype Findings between Papule and Ulcer.

	Pápula	Úlcera	Total	<i>p</i> valor
CCT	26 (48,15%)	28 (51,85%)	54	0,7223
TT -	8 (53,33%)	7 (46,67%)	15	

The genotyping revealed that the isolates of *L. braziliensis* displayed the haplotypes CCT and TT- at the CHR28/425451 locus. No statistically significant difference was observed in the proportions of CCT and TT- found between ulcers and papules, indicating that, in general, the same parasitic strain was present in the original ulcerated lesions and in the disseminated lesions.

The alignment of the sequences obtained for the CHR28/425451 locus among the *L. braziliensis* from the participants of the study exemplified in figure 4 reveals the substitutions of cytosines (i.e., “C”) to thymines (i.e., “T”) at the polymorphic position 286 of that locus: parasites with the CCT haplotype will present “C” at position 286 as shown in this figure; TT-parasites will present “T” at position 286.

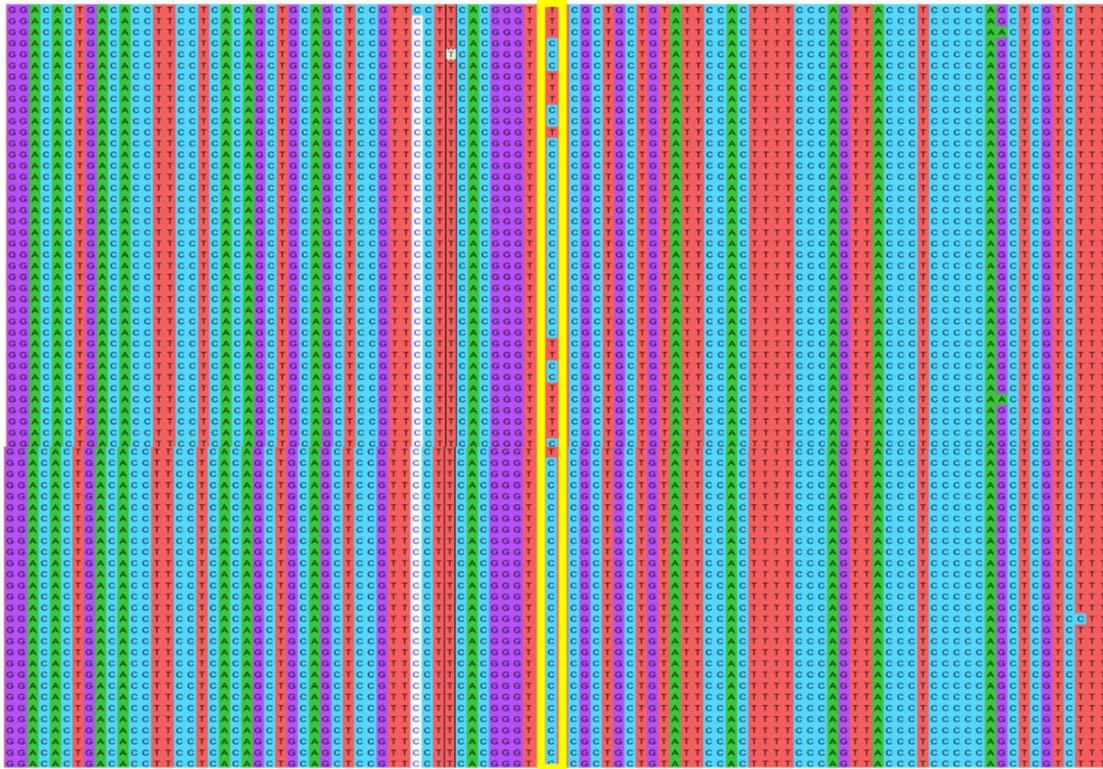


Figure 4. Alignment of nucleotide sequences from the CHR 28/42545122 locus of *L.(V) braziliensis* isolates from 22 patients with Disseminated Cutaneous Leishmaniasis from Corte de Pedra/BA. The highlighted position is 286 of the CHR 28/425451 locus.

Figure 5 shows the variation over time of approximately 6,000 patients treated at PSDJMC between 2012 and 2022. Considering only the data from the figure, it is evident that the frequency of LTA diagnoses at the clinic shows significant fluctuations over time, with periods of higher or lower numbers of patients. The year 2012 stands out particularly in the evaluated fragment because the total number of patients diagnosed with LTA ($n=1,747$) was about four times greater than the average number of cases in the subsequent years (i.e., 2013 to 2022, $n=425$). If this discrepancy does not reflect a redistribution of LTA diagnoses to other health clinics in the region in the years following 2012, this finding indicates that a significant outbreak of LTA occurred in Baixo Sul that year. Even considering only the years from 2013 to 2022, it is possible to notice a fluctuation in the diagnosis of LTA at the Corte de Pedra post. The years 2013, 2017, and 2018 had an annual average of 701 cases, while the other years had approximately half that number of diagnoses, with an average of 307 cases per year.

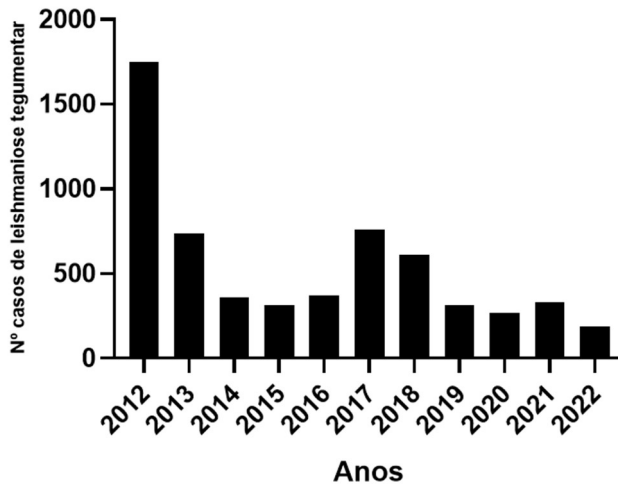


Figure 5. Total number of patients attended at PSDMJC between 2012 and 2022.

Even considering only the years from 2013 to 2022, it is possible to notice a fluctuation in the diagnosis of LTA at the Corte de Pedra post. The years 2013, 2017, and 2018 had an annual average of 701 cases, while the other years had approximately half that number of diagnoses, with an average of 307 cases per year.

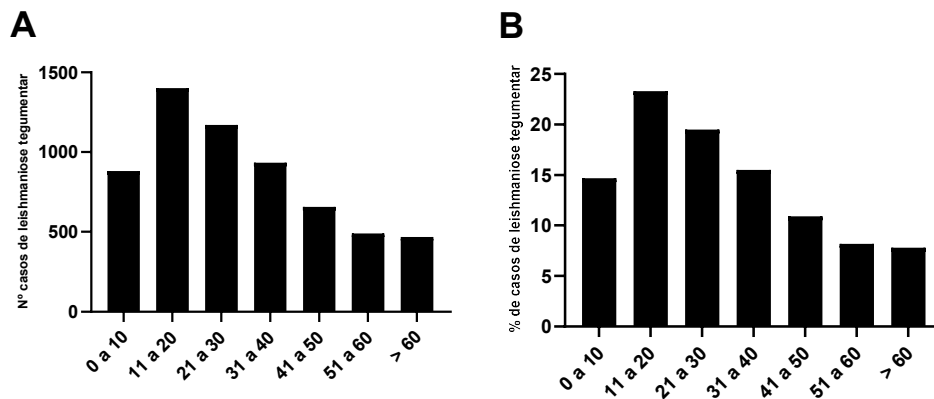


Figure 6. Age of patients treated between 2012 and 2022. A) Number of LTA cases. B) Frequency of LTA cases.

In relation to the gender distribution (Figure 7), it is observed that between 2012 and 2022, 60.9% of the LTA diagnoses at PSDJMC corresponded to men, while 39.1% were women, supporting previously published data (Silva et al., 2017) for this and other areas endemic to LTA.

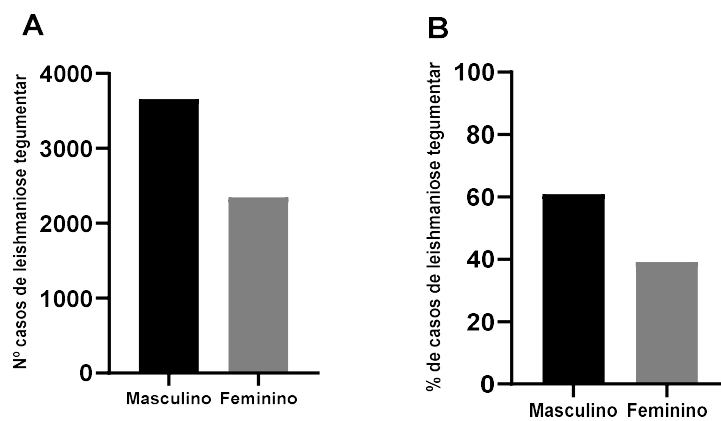


Figure 7. Number of patients attended at PSDMJC between 2012 and 2022 stratified by gender. A) Number of LTA cases by gender. B) Percentage of cases by gender.

Seeking a broader understanding of the fluctuation of the LTA (American Cutaneous Leishmaniasis) endemicity in the Baixo Sul region of Bahia, as detected by the diagnoses conducted at PSDJMC, we expanded the assessment above to reflect the period from 1999 to 2022, incorporating previously published data that extended from 1999 to 2011 (Silva et al., 2017). The consolidated analysis shown in figure 8 reveals that in the five years between 2008 and 2012, there was a marked increase in the number of LTA diagnoses at that facility ($n=6,403$), accounting for 47% of all cases diagnosed in the 23-year study period ($n=13,599$). It is important to note that in the previous study covering the years from 1999 to 2011, we had not included the years 2004 to 2007. Although we have not formally tested the correlation between time and the number of diagnosed cases of LTA, there seems to be a progressive decline in the number of diagnoses at that post in recent years. The average number of LTA diagnoses in the years presented in figure 8 preceding the peak from 2008 to 2012 was 608 cases, doubling to 1,280 between 2008 and 2012, and then dropping to 425 LTA diagnoses per year between 2013 and 2022.

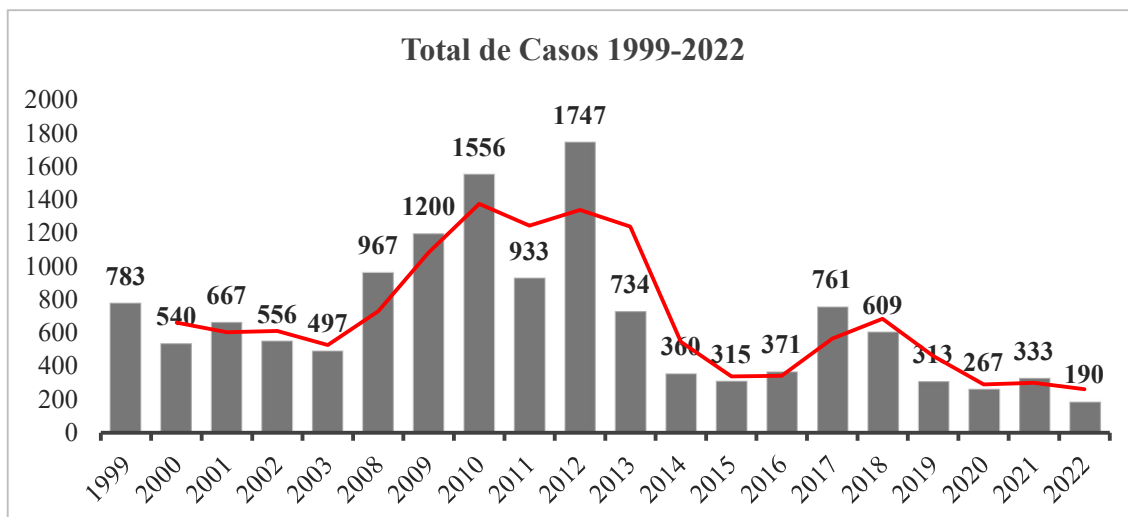


Figure 8. Evolution of diagnoses of American Tegumentary Leishmaniasis in PSDMJC from 1999 to 2022.

It is important to highlight that there were apparent differences in the fluctuations of the diagnoses of the different forms of LTA in the PSDJMC (Figure 9). It is observed that the cutaneous form is more prevalent than the mucosal and disseminated forms throughout the analyzed years.

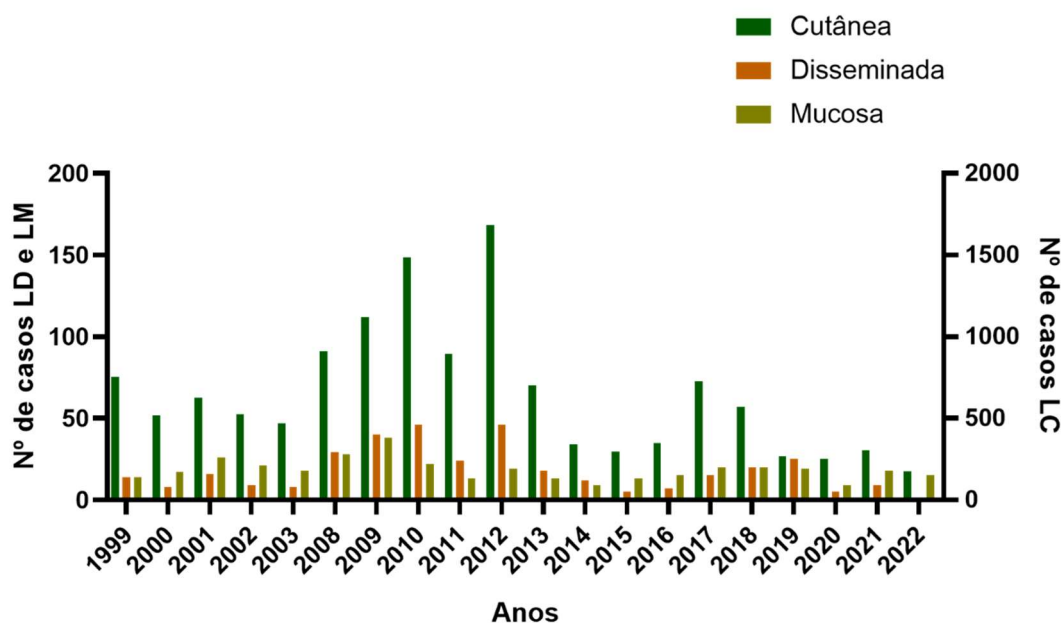


Figure 9. Monitoring of LTA cases in the three clinical forms (LC, LM, and LD) from 1999 to 2022.

Although LC is more prevalent, it presents significant positive correlations with LM ($r= 0.5108$; $p= 0.0214$) and LD ($r= 0.8005$; $p= <0.0001$). Furthermore, LM and LD also showed a moderately positive correlation ($r= 0.5659$; $p=0.0093$) in the period (Figure 10 A, B and C).

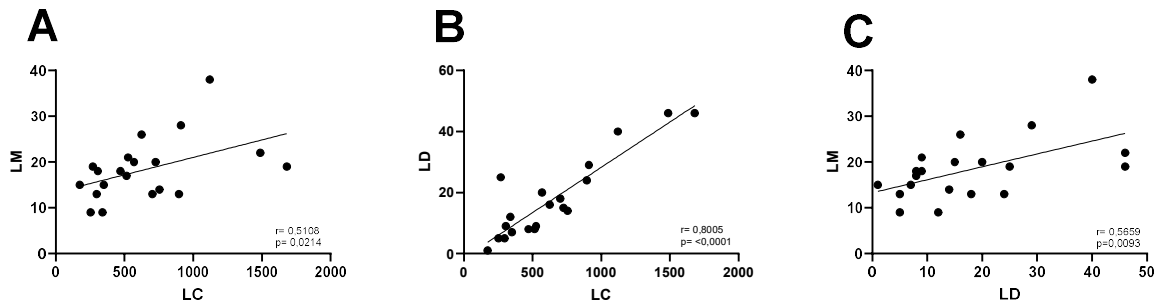


Figure 10. Correlation between the frequencies of diagnoses of clinical forms of LTA in PSDMJC. A) Correlation between mucocutaneous leishmaniasis (ML) and cutaneous leishmaniasis (CL). B) Correlation between disseminated leishmaniasis (DL) and cutaneous leishmaniasis (CL). C) Correlation between mucocutaneous leishmaniasis (ML) and disseminated leishmaniasis (DL). The statistical test applied was the Spearman correlation coefficient.

To evaluate the external validity of our findings regarding the fluctuation of LTA (American Tegumentary Leishmaniasis) endemicity in Baixo Sul da Bahia, based on the variation in diagnoses in Corte de Pedra, we analyzed the distribution of LTA notification data for the municipality of Presidente Tancredo Neves, where the health post is located, and LTA diagnoses in PSDJMC. The notification data for LTA from 1999 to 2022, listed in the SINAN (National System of Notification of Diseases) and DIVEP/SESAB (Directorate of Epidemiological Surveillance/Health Secretariat of the State of Bahia), are presented in figure 11. Notably, there is a gap of three years (2004, 2005, and 2006) in both the SINAN and DIVEP data.

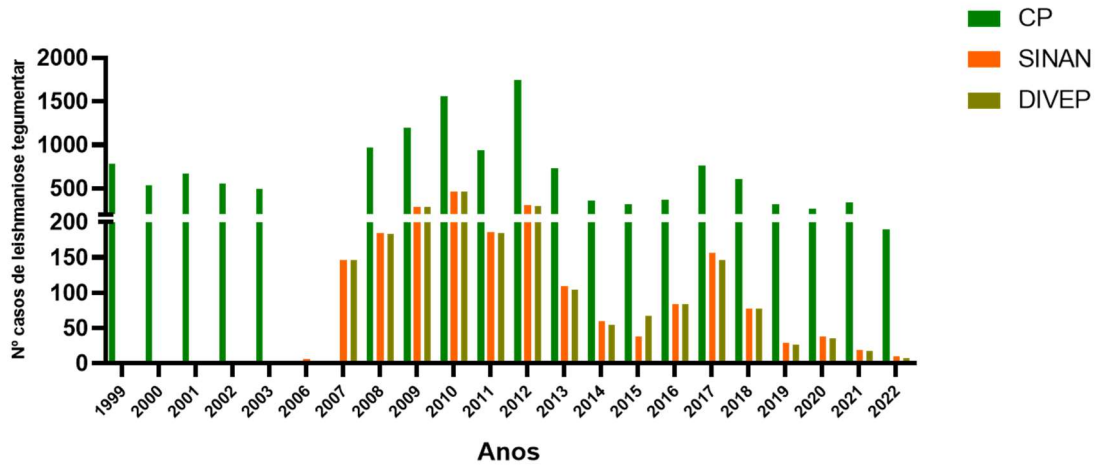


Figure 11. Comparison of the number of diagnosed cases of American Cutaneous Leishmaniasis in PSDMJC and the number of notifications registered by DIVEP and SINAN in the Municipality of Presidente Tancredo Neves between 2002 and 2022.

The simple visual impression conveyed by Figure 12 suggests a substantial overlap with everything described above regarding the PSDJMC. This impression is confirmed by the highly significant positive correlations between the diagnostic data for LTA at that health post and the data recorded in the notification banks of SINAN and DIVEP (Figures 12 A, B, and C).

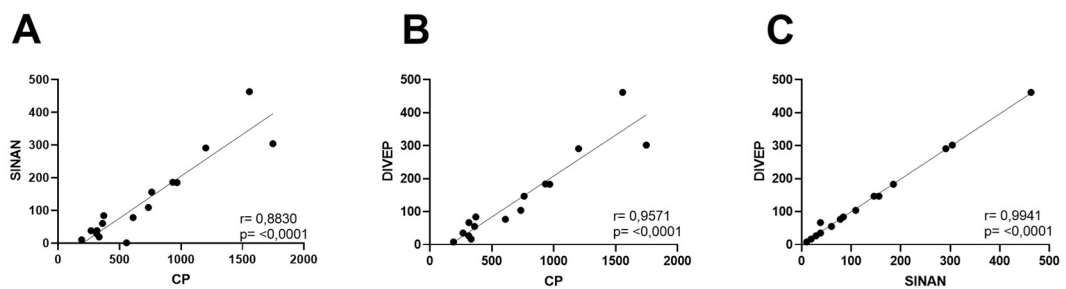


Figure 12. Correlation between the number of diagnosed LTA cases at PSDJMC and reported cases in the Municipality of Presidente Tancredo Neves from 1999 to 2022. A) Correlation between SINAN and CP. B) Correlation between DIVEP and CP. C) Correlation between DIVEP and SINAN. The statistical test applied was the Spearman correlation coefficient.