



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



---

## Monografia

# **Padronização do teste cutâneo de leishmanina em cães e sua associação com variáveis clínicas e laboratoriais**

**Juliano César Santos Leite**

Salvador (Bahia)  
Junho, 2016

**FICHA CATALOGRÁFICA**

(elaborada pela Bibl. Tatiana Bonfim Souza, da Bibliotheca Gonçalo Moniz : Memória da Saúde Brasileira/SIBI-UFBA/FMB-UFBA)

L533 Leite, Juliano César Santos.  
Padronização do teste cutâneo de leishmanina em cães e sua associação com variáveis clínicas e laboratoriais / Juliano César Santos Leite. (Salvador, Bahia): JCS, Leite, 2016.

viii 33 fls.

Monografia, como exigência parcial e obrigatória para conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Professor orientador: Washington Luis Conrado dos Santos.

Palavras chaves: 1. Leishmaniose visceral. 2. Cães. 3. Testes cutâneos I. dos-Santos, Washington Luis Conrado. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU: 616.993.161



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Padronização do teste cutâneo de leishmanina em cães e sua associação com variáveis clínicas e laboratoriais**

**Juliano César Santos Leite**

Professor orientador: **Washington Luis Conrado dos Santos**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2015.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)  
Junho, 2016

**Monografia:** *Padronização do teste cutâneo de leishmanina em cães e sua associação com variáveis clínicas e laboratoriais*, de **Juliano César Santos Leite**.

Professor orientador: **Washington Luis Conrado dos Santos**

**COMISSÃO REVISORA:**

- **Washington Luis Conrado dos Santos**, (Presidente, Professor orientador), Professor do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Edna Lucia Santos de Souza**, Professora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Carolina Lara Neves**, Professora do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.
- **Marco Antonio Cardoso de Almeida**, Professor do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:**

Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no X Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

*“But you know, happiness can be found even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light.”* (extraído do livro “Harry Potter and the Prisoner of Azkaban”, de **J.K. Rowling**)

Aos Meus Pais, **Rubens Leite**  
e **Vera Leite**, por incentivo e  
amor constantes e infindáveis.

## **EQUIPE**

- Juliano César Santos Leite, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: leite.juliano@live.com;
- Washington Luís Conrado dos Santos, Professor orientador, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, Chefe do Laboratório de Patologia e Biointervenção (LPBI) da Fundação Oswaldo Cruz-BA;
- Micely D’el Rei Hermida, Pós-Doutora do Laboratório de Patologia e Biointervenção da Fundação Oswaldo Cruz-BA; e
- Jade Braga Lopes, Estudante de Medicina, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

### **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

- Laboratório de Patologia e Biointervenção (LPBI)

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

1. Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (CYTED)
2. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)
3. Recursos do Laboratório de Patologia e Biointervenção (LPBI) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz (Bahia)

## AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu Professor orientador, Doutor **Washington Luís Conrado dos Santos**, pelas substantivas orientações acadêmicas na construção desta monografia.
- ◆ À Doutora **Micely D El Rei Hermida**, pelo estímulo ao raciocínio científico e pelos ensinamentos relativos à prática laboratorial.
- ◆ Aos Professores **Edna Lúcia Santos de Souza**, **Carolina Lara Neves** e **Marco Antonio Cardoso de Almeida**, membros da Comissão Revisora desta Monografia, pela leitura cuidadosa do trabalho e sugestões para seu aprimoramento.
- ◆ À minha colega **Jade Braga Lopes**, por ter disponibilizado seu tempo e seu cuidado para auxiliar na execução dos experimentos e análises que originaram este trabalho.



## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS E TABELAS</b>	<b>2</b>
<b>I. RESUMO</b>	<b>3</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>5</b>
<b>IV. METODOLOGIA</b>	<b>9</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>13</b>
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>20</b>
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	<b>24</b>
<b>VIII. SUMMARY</b>	<b>25</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>26</b>
<b>X. ANEXOS</b>	
•ANEXO I: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	33

## **ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS**

### **FIGURAS**

FIGURA I. Representação esquemática do desenho experimental do estudo	10
---	----

### **GRÁFICOS**

GRÁFICO 1. Distribuição de cães por ELISA, cultura esplênica e TCL	17
GRÁFICO 2. Distribuição de cães conforme emagrecimento, cultura esplênica e TCL	18
GRÁFICO 3. Contagens de eritrócitos nos cães infectados	18

### **TABELAS**

TABELA 1. Características gerais da população estudada	13
TABELA 2. Frequências de cães que apresentaram reação após aplicação do TCL	15
TABELA 3. Distribuição de sinais clínicos por resultado no TCL	16
TABELA 4. Distribuição de sinais clínicos por ELISA, cultura e TCL	19

## I. RESUMO

**Padronização do teste cutâneo de leishmanina em cães e sua associação com variáveis clínicas e laboratoriais.** O diagnóstico da leishmaniose visceral canina é dado pelo quadro clínico e por testes laboratoriais, sorológicos e parasitológicos. Entretanto, o reconhecimento de infecção dissociada de doença é mais difícil. Nesses casos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o teste cutâneo da leishmanina (TCL) têm sido usados como indicadores de infecção. Adicionalmente o TCL tem sido utilizado como um marcador de resistência ao desenvolvimento de leishmaniose visceral. Não há, porém, padronização na aplicação ou interpretação dos resultados desse teste em cães. Este é um estudo derivado de um trabalho experimental, que objetivou definir os parâmetros para aplicação e interpretação adequada do TCL em cães no que diz respeito à concentração do antígeno, local da injeção e tempo ideal para leitura do resultado, associando os resultados a variáveis clínicas e laboratoriais. Para tal, foram coletados os dados de 395 cães de Jequié-BA, área endêmica de leishmaniose visceral, entre os anos de 1997 e 2008. Foram excluídos todos os animais que não realizaram teste cutâneo, assim como os que morreram ou fugiram antes de serem avaliados, restando uma população final de 280 animais. Buscamos os registros das áreas de induração do TCL, dados clínicos e resultados de cultura, sorologia, PCR hemograma, e exames de bioquímica sérica. Após análises, foi demonstrado que os melhores parâmetros para realização do TCL são 250 µg de antígeno e leitura da reação 48 horas após aplicação do antígeno. Foram obtidos resultados similares quando o a injeção se deu em áreas de pele espessa e pele fina. TCL positivo mostrou-se associado a menores frequências de soropositividade, emagrecimento e úlceras de pele e a maiores níveis de eritrócitos.

Palavras chave: 1. Leishmaniose Visceral; 2. Cães; 3. Testes Cutâneos

## **.II. OBJETIVOS**

### GERAL

Definir condições adequadas para o uso do teste cutâneo de Leishmanina em cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral e correlacionar a presença de induração com parâmetros clínicos e laboratoriais.

### ESPECÍFICOS

1. Determinar a dose de antígeno mais adequada;
2. Caracterizar o sítio de injeção mais adequado;
3. Especificar o tempo mais adequado para leitura da reação;
4. Correlacionar o resultado do teste cutâneo com dados clínico-laboratoriais.

### III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A leishmaniose visceral zoonótica, popularmente conhecida como calazar, é endêmica no Brasil e em partes da África, Ásia e Europa. Estima-se que essa doença tenha um custo estimado em termos de DALY (disability adjusted life years) de 2,1 milhões de anos (Townson et al., 2005). No Brasil, cerca de 40.000 indivíduos foram acometidos por leishmaniose visceral entre os anos de 2000 e 2010, com um predomínio no número de casos na região Nordeste; apesar de a região ter reduzido seus índices de 85% em 2000 para 53% em 2010, continua tendo destaque no cenário nacional (Ministério da Saúde, 2010a). A letalidade média do período no país foi de 6,3%, sendo que os principais fatores associados foram sexo masculino (63,4%), cor morena (61,9%), idade menor que 15 anos (37%), e residência na região nordeste (56%) (Ministério da Saúde, 2010b; Martins-Melo et al., 2014). O perfil da doença, que antes era essencialmente rural, alterou-se e, hoje, a leishmaniose visceral atinge também áreas urbanas médias e grandes.

A enfermidade é mantida nos centros urbanos por um ciclo de infecção que envolve seres humanos, um vetor flebotomíneo – no Brasil, predominantemente *Lutzomyia longipalpis* – (Lainson; Rangel 2005) e vertebrados não humanos. Há evidências de que dentre os vertebrados susceptíveis à infecção, os cães constituem o principal reservatório urbano da *Leishmania infantum (chagasi)*, o parasito associado à leishmaniose visceral no Brasil (Dye, 1996; Quinnell et al., 1997).

A apresentação clínica da leishmaniose visceral humana pode ser definida didaticamente em três fases: (1) a fase aguda tem sintomatologia variável, mas na maioria das vezes se caracteriza pela manutenção do estado geral do paciente, febre por menos de 4 semanas, palidez cutâneo-mucosa, e hepatoesplenomegalia, com o baço geralmente ultrapassando o rebordo costal esquerdo em menos de 5 cm. Em áreas endêmicas, essa fase pode ser menos expressiva, oligossintomática, se apresentando com febre baixa, palidez, diarreia e/ou tosse não produtiva e hepatoesplenomegalia discreta, sendo necessário exames laboratoriais para fazer o diagnóstico, por ser facilmente confundida com outras enfermidades; (2) o período de estado é caracterizado por febre irregular, emagrecimento progressivo, palidez

cutâneo-mucosa e progressão da hepatoesplenomegalia. O estado geral é comprometido nessa fase, e o período de evolução é mais longo, durando, frequentemente, mais de 2 meses; (3) finalmente, o período final começa se a doença não é tratada; se apresenta como evolução para febre intensa e maior comprometimento do estado geral, além de desnutrição, edema de membros inferiores, hemorragias, icterícia e ascite. Fatalmente, se não houver tratamento, o óbito ocorre, geralmente secundário a infecções bacterianas e/ou sangramentos (Ministério da Saúde, 2014).

Já em cães, os sinais da leishmaniose visceral mais frequentemente encontrados são linfonodomegalia e lesões de pele. Entretanto, uma vasta gama de sinais clínicos podem estar presentes, como caquexia, hepatoesplenomegalia, febre, hipotrofia muscular, letargia, membranas hipocoradas, epistaxe, edema de articulações, dermatite (descamativa, ulcerada, papular, nodular ou pustulosa), lesões semelhantes a lupus ou pênfigo, onicopatia, hiperqueratose nasodigital, lesões palpebrais, corneanas e de conjuntiva, queratite nodular e ceratoconjuntivite, lesões de esclera, lesões granulomatosas ou difusas de úvea anterior e lesões da úvea posterior, lesões orbitais granulomatosas, miosite de musculatura extrínseca ocular e envolvimento gastrointestinal ou neurológico. Alguns desses sinais, como a hepatoesplenomegalia, são melhor detectados nos animais com métodos de imagem, como ultrassonografia (Paltrinieri et al., 2010).

O diagnóstico da leishmaniose visceral se baseia na presença de sinais clínicos da enfermidade em conjunto com testes laboratoriais sorológicos ou parasitológicos, incluindo reação em cadeia da polimerase (PCR), para identificação de resposta específica ou do próprio parasito (Killick-Kendrick, 1999; Solano-Gallego et al., 2001; Barrouin-Melo et al., 2004; Solca et al., 2012). A identificação de infecção na ausência de enfermidade é mais problemática. Os níveis de anticorpos séricos podem estar abaixo do limite de detecção em seres humanos e em cães com infecção recente ou que controlaram eficientemente a infecção (Cardoso et al., 1998; Paranhos-Silva et al., 2003; Dos-Santos et al., 2008). Os testes de PCR e a identificação de resposta imune celular contra o parasito, através do teste cutâneo da leishmanina (TCL), têm sido utilizados na estimativa da prevalência de infecção em populações de seres humanos e de cães (Gidwani et al., 2009; Solca et al., 2012).

Além do uso como um indicador de infecção, o TCL tem sido utilizado também como um marcador de resistência à leishmaniose visceral humana e canina (Carvalho et al., 1992; Pinelli et al., 1994; Martinez-Moreno et al., 1995; Solano-Gallego et al., 2001; Borja-Cabrera et al., 2002; Molano et al., 2003). Em cães, porém, há considerável controvérsia na literatura sobre o uso, aplicação e interpretação dos resultados do TCL. Por exemplo, não há definição precisa sobre o sítio mais apropriado para injeção do antígeno: abdome, porção interna da coxa traseira, face interna da orelha têm sido utilizados (Melo et al., 1977; Cardoso et al., 1998; Solano-Gallego et al., 2001); induração apenas, ou induração e hiperemia têm sido definidas como respostas positivas por diferentes grupos (Cardoso et al., 1998; Solano-Galeno et al., 2001; dos-Santos et al., 2008); não há validação sobre o tamanho da área de resposta que deva ser considerada positiva nem consenso sobre a dose de antígeno a ser empregada (Baleeiro et al., 2006).

Uma melhor padronização do TCL em cães pode trazer muitas vantagens para a pesquisa de soluções para a leishmaniose visceral pelas seguintes razões: (1) A cura ou a resistência à leishmaniose visceral está associada com a resposta imune efetora celular (Carvalho et al., 1992). (2) Em seres humanos, há uma relação entre TCL positivo e resistência à leishmaniose visceral. (3) Há evidências de que também em cães o TCL, junto a outros marcadores, reflita um estado de resistência contra leishmaniose visceral. (4) Há uma grande necessidade de testes de fácil uso que possam indicar resistência ou susceptibilidade à leishmaniose visceral canina para uso em pesquisa de vacinas, abordagens terapêuticas e de novas estratégias de intervenção, visando a profilaxia da enfermidade (cães com perfil de resistência a enfermidade deveriam ser removidos indiscriminadamente das áreas endêmicas?).

Assim, pretendeu-se definir as condições adequadas de uso do antígeno de *L. infantum* no teste cutâneo em cães: dose adequada, sítio de inoculação e tempo ideal de leitura do TCL. Almeja-se contribuir na identificação de marcadores com potencial uso na definição de desfecho da infecção por *L. infantum* em cães.

Este trabalho faz parte de um projeto maior, que visa: (1) a padronização de dois testes baseados na resposta imune celular para detecção de infecção e de imunidade em cães infectados por *Leishmania*, sendo eles o teste cutâneo de Leishmanina e a avaliação da produção

de interferon de células do sangue periférico incubadas com antígeno de Leishmania; e (2) a pesquisa de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na desestruturação da polpa branca do baço, associada ao desenvolvimento de formas graves da leishmaniose visceral em seres humanos e em cães.



## IV. METODOLOGIA

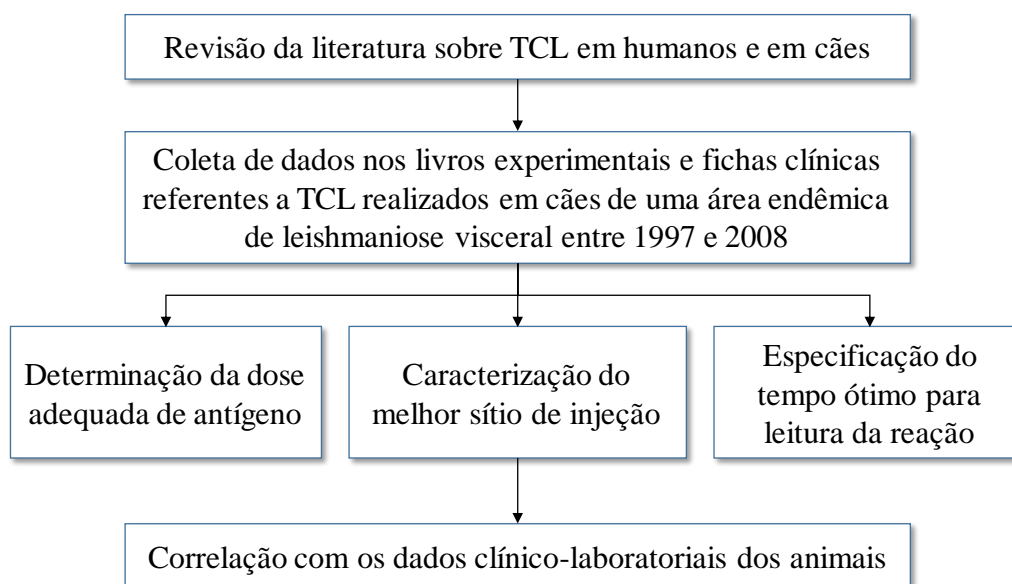
Este trabalho foi derivado da análise de dados provenientes dos cadernos experimentais de estudo feito por outros membros do grupo de pesquisa durante um período de 11 anos. Ao longo de diversas excursões, 395 cães foram coletados das ruas da cidade de Jequié (Bahia), uma área endêmica para leishmaniose visceral, durante um estudo sequencial de monitoramento da prevalência da infecção em cães de rua realizado em colaboração com o Serviço Municipal de Controle de Zoonoses e com o Centro de Controle de Endemias Pirajá da Silva - PIEJ, entre 1997 e 2008. Naquele período os animais foram injetados intradermicamente com antígeno bruto sonicado de *L. infantum (chagasi)* em diferentes doses e em diferentes sítios da pele. As reações foram lidas nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a injeção. O tamanho da área de induração foi medido por um observador sem o conhecimento do local preciso da injeção do antígeno ou diluente (salina).

### IV.1. Questões examinadas e delineamento experimental

Foram resgatados os livros experimentais dos experimentos e avaliações realizadas nos cães de Jequié, entre 1997 e 2008, que incluíam exames clínicos, hemograma, testes de bioquímica sérica, ELISA, cultura esplênica, TCL e PCR de fragmentos de baço. Foram excluídos da análise os animais que sumiram ou morreram antes de serem avaliados e os que não realizaram o TCL e os dados obtidos foram consolidados e registrados em planilhas do Microsoft Excel entre os anos de 2012 e 2013.

A partir dos dados obtidos, determinou-se a dose adequada de antígeno para o TCL, caracterizou-se o melhor sítio de injeção e especificou-se o tempo ótimo para leitura da reação. Definidas essas condições, correlacionou-se os resultados do TCL com variáveis clínico-laboratoriais dos cães (Figura I). Os demais subtópicos desta metodologia referem-se aos experimentos realizados em Jequié.

**Figura I.** Representação esquemática do desenho experimental do estudo



## IV.2. Antígenos de Leishmania

Promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR2000/Merivaldo2) foram caracterizadas por isoenzimas e reatividade com anticorpos monoclonais específicos para a espécie (Dr. G. Grimaldi, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro). Os parasitas foram cultivados *in vitro* usando meio Schneider (Gibco) contendo 10% de soro bovino fetal (Cultlab). As amostras foram lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (em inglês, *phosphate-buffered saline* – PBS) 0,15 M, pH 7,4 e lisadas com ciclos repetidos de congelamento e descongelamento seguidos por sonicação. O antígeno foi preparado de forma estéril e não foram adicionados inibidores enzimáticos ou agentes preservantes. Suspensões de antígeno foram armazenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso.

## IV.3. Teste cutâneo de leishmanina

O antígeno de *L. infantum* foi diluído em salina até uma concentração de 2,5 mg de proteína por ml. No momento da aplicação, a solução foi novamente diluída para conter 125  $\mu\text{g}$ , 250  $\mu\text{g}$  ou 500  $\mu\text{g}$  de antígeno por volume aplicado. Cada animal recebeu intradermicamente 100  $\mu\text{L}$  da solução antigênica, com uma ou mais das 3 doses descritas em

diferentes regiões cutâneas. Foram estudadas regiões de pele fina, representada pela região medial à linha mamilar, e de pele espessa, representada por flanco. Como controle negativo, 100 µL do diluente (salina) foi injetado em uma região diferente da pele. Nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a injeção, as características e tamanho da lesão formada na área da injeção foram registradas por observadores sem conhecimento prévio do local das injeções. As leituras foram feitas com o auxílio de uma caneta esferográfica. Um registro feito com feita adesiva da área medida foi obtido em todos os animais e preservado no livro experimental, para confirmação posterior, se necessária. Os resultados foram expressos como a média dos dois maiores eixos perpendiculares da área de induração.

#### **IV.4. Dados clínicos**

Todos os animais foram submetidos a exame clínico, com ênfase dada a parâmetros considerados indicativos de leishmaniose visceral canina usando critérios previamente definidos por Lima et al. (2014). Os parâmetros clínicos usados foram alopecia, anemia, conjuntivite, desidratação, dermatite, emaciação, erosão cutânea, linfadenopatia, onicogribose, esplenomegalia e presença de pústulas e/ou úlceras. Todos os animais foram agrupados em assintomáticos ou sintomáticos de acordo com os sinais clínicos reportados sugestivos de leishmaniose visceral, sendo considerados sintomáticos quando 3 ou mais sinais estiveram presentes.

#### **IV.5. Bioquímica sérica e estudos hematológicos**

Amostras de sangue para análises bioquímicas e hematológicas foram coletadas da veia cefálica dos cães sob restrição manual. As amostras foram preservadas em tubos EDTA-2Na (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria) e em tubos de coleta de sangue (BD Vacutainer®; Becton. Dickinson and Co., BR) e foram examinados no mesmo dia. Contagem de hemácias e leucócitos foram obtidas usando um contador automático de células (Pentra 80 counter, ABX Diagnostics, Montpellier, França). Tubos de microhematócrito contendo as amostras foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos, e o hematócrito foi estimado. Também foi feita contagem diferencial de células sanguíneas. O soro coletado por centrifugação nos tubos Vacutainer® foi usado para os seguintes testes bioquímicos, usando um método colorimétrico

com um analisador A15 (BioSystems, Barcelona, Espanha): proteínas totais, albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total, fosfatase alcalina, ureia e creatinina.

#### **IV.6. Análise e expressão dos resultados**

Os dados numéricos apresentados no texto, tabelas e gráficos representam valores absolutos, médias ou proporções, conforme indicado. Para variáveis contínuas, a significância das diferenças entre os grupos foi testada usando o teste de Mann-Whitney quando houve 2 grupos e o teste de Kruskal-Wallis quando mais de 2 grupos estiveram envolvidos. Quando o teste foi significativo, a diferença entre 2 grupos foi identificada usando o teste de comparação múltipla de Dunn. Para comparações envolvendo proporções, o teste qui-quadrado, o teste exato de Fisher ou o teste qui-quadrado para tendências foi usado conforme recomendado. O nível de significância estatística crítico foi estabelecido como  $p < 0,05$ .

#### **IV.7. Considerações éticas**

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações da FIOCRUZ para manipulação e experimentação com animais. O estudo tem aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do CPqGM-FIOCRUZ (CEUA, parecer n° 040).

## V. RESULTADOS

### V.1. Características gerais da população

Dos 395 cães examinados, foram excluídos 115 por não terem realizado o TCL, ou por terem fugido ou ido a óbito antes da avaliação clínica. A população final foi, portanto, de 280 cães, entretanto, nem todos foram submetidos integralmente a todos os exames clínicos e laboratoriais. As principais características dos animais testados estão descritas na Tabela 1, sendo que para cada variável é apresentado o denominador, representando quantos cães foram avaliados para aquele aspecto específico.

**Tabela 1.** Características gerais da população estudada

<b>Parâmetro</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
N	280	(100)
Gênero:		
Fêmea	92/242	38%
Macho	150/242	62%
Idade estimada:		
<2 anos	2/53	4%
3-5 anos	38/53	72%
>6 anos	13/53	24%
Tamanho:		
Pequeno	25/98	26%
Médio	53/98	54%
Grande	20/98	20%
Clinicamente sintomáticos	87/180	48%
Teste positivo para infecção por Leishmania		
Sorologia (ELISA)	134/272	49%
Cultura esplênica	79/258	31%
PCR	82/89	92%

## V.2. Definição dos parâmetros do TCL

As frequências de cães que apresentaram resposta ao TCL estão discriminadas na Tabela 2. A tabela também mostra os números de animais que não apresentaram induração, mas mostraram hiperemia em resposta ao teste.

A espessura da pele onde o antígeno foi aplicado não mostrou exercer influência na frequência de cães que demonstraram uma reação cutânea positiva ( $p=0,36$ ). As condições do teste foram 250  $\mu\text{g}$  de antígeno injetado e 48 horas entre injeção e leitura da reação. Entretanto, as áreas de induração foram maiores quando o teste foi feito em pele espessa ( $14,9 \text{ mm} \pm 7,4$  em comparação a  $6,2 \text{ mm} \pm 2,9$ ;  $p<0,0001$ ).

Analisando-se os resultados do teste feito em região de pele fina com a dose de 250  $\mu\text{g}$ , o número de cães que apresentaram área de induração maior que 5 mm foi maior quando os resultados do teste foram lidos 48 horas após a injeção intradérmica, em comparação com coleta do resultado após 24 horas ou 72 horas (respectivamente  $p=0,0002$  e  $p=0,0015$ ).

Comparando-se diferentes doses quando a reação foi lida 48 horas após as injeções, o número de animais com áreas de induração maiores que 5 mm foi maior para a dose de 250  $\mu\text{g}$  do que para 125  $\mu\text{g}$  ( $p=0,0251$ ). Não foi encontrada diferença estatística comparando-se 250  $\mu\text{g}$  e 500  $\mu\text{g}$ .

Dessa forma, a dose de 250  $\mu\text{g}$ , o tempo de 48 horas e a aplicação do teste em pele fina foram escolhidos como parâmetros para as análises subseqüentes por serem as condições em que o teste mostrou resultados no maior número de animais com a menor quantidade de antígeno, também porque a pele fina é mais semelhante com a pele humana e porque a amostra de cães em que o teste foi feito nesse tipo de pele foi maior do que os cães em que o TCL foi aplicado em regiões de pele espessa.

**Tabela 2.** Frequências de cães que apresentaram reação após aplicação do TCL

Dose	Tempo (h)	Tipo de reação	n/N	%	Tamanho médio (mm)	Desvio-padrão	Frequência <5 mm	%	Frequência ≥5mm	%
125 µg	24	Hiperemia	11/94	11,7	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
		Induração	0/94	0	0	0	0	0	0	0
	48	Hiperemia	8/204	3,9	8,2 <sup>b</sup>	2,137	0	0	6	3
		Induração	21/204	10,3	7	3,892	4	2	17	8,3
	72	Hiperemia	0	0	-	-	-	-	-	-
		Induração	7/91	7,7	4,9	2,528	3	3,3	4	4,4
250 µg	24	Hiperemia	15/132	11,4	5 <sup>c</sup>	-	-	-	1	0,8
		Induração	5/132	3,8	6,2	1,754	1	0,8	4	3
	48	Hiperemia	5/278	1,8	5	2,739	2	0,7	3	1,1
		Induração	59/278	21,2	6,2	2,924	17	6,1	42	15,1
	72	Hiperemia	0	0	-	-	-	-	-	-
		Induração	7/93	7,5	4,9	1,397	4	4,3	3	3,2
500 µg	24	Hiperemia	3/38	7,9	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
		Induração	3/38	7,9	7,2	3,175	1	2,6	2	5,3
	48	Hiperemia	0	0	-	-	-	-	-	-
		Induração	27/103	26,2	5,8	2,929	13	12,6	14	13,6
250 µg – pele espessa	48	Hiperemia	0	0	-	-	-	-	-	-
		Induração	8/39	20,5	14,9	7,405	0	0	8	20,5

a: nenhuma das áreas foi mensurada; b: apenas 6/8 foram mensuradas; c: apenas uma foi mensurada

### V.3. Associação do TCL com exames sorológicos, parasitológicos e sinais clínicos

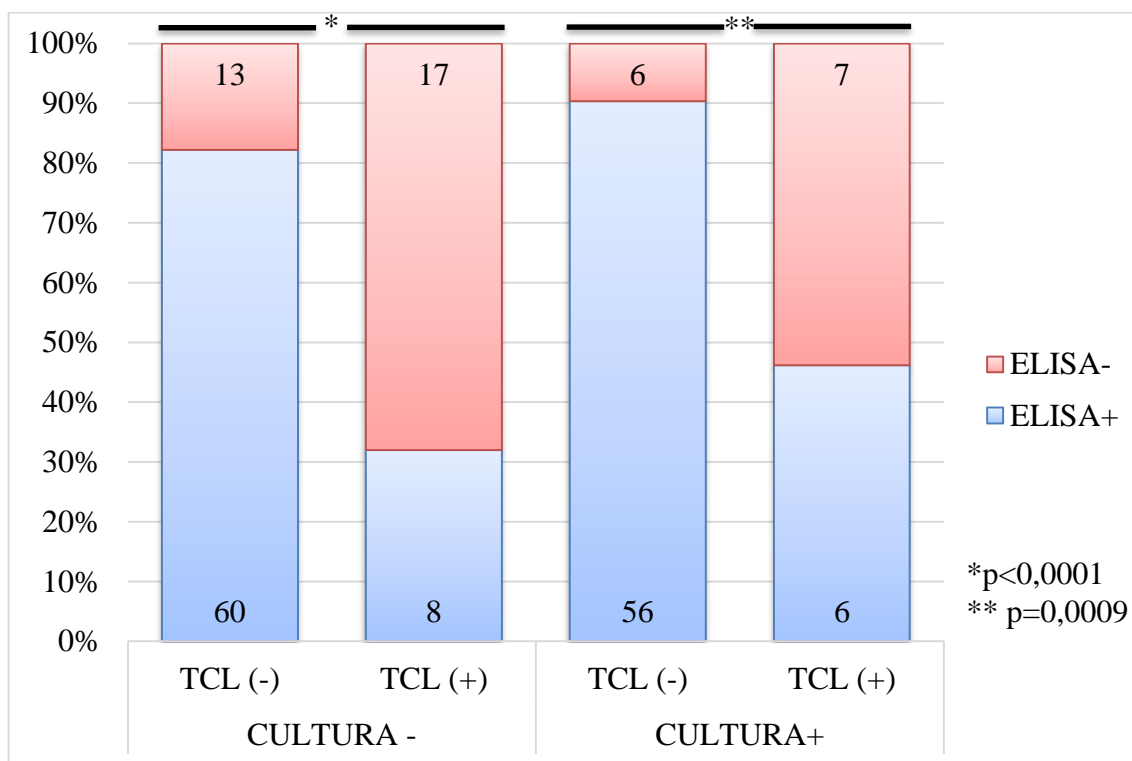
Os sinais clínicos foram distribuídos entre os cães com TCL positivos e negativos, conforme mostrado na tabela 3. Cães com o teste positivo apresentaram menor frequência de emaciação e úlceras de pele (respectivamente  $p=0,0017$  e  $p=0,0006$ ). Os demais sinais clínicos não atingiram significância estatística.

**Tabela 3.** Distribuição de sinais clínicos por resultado no TCL

	TCL-	TCL+
Emaciação	66/136	8/32 <sup>a</sup>
Dermatite	47/117	5/15
Alopécia	51/114	8/15
Anemia clínica	19/57	1/10
Conjuntivite	33/113	4/14
Desidratação	1/30	1/8
Erosão cutânea	1/31	0/8
Úlceras cutâneas	3/31	6/8 <sup>b</sup>
Pústulas	1/31	0/8
Linfadenomegalia	49/113	5/13
Esplenomegalia	23/48	5/10
Onicogribose	25/114	3/14

a:  $p = 0,0017$  b:  $p = 0,0006$



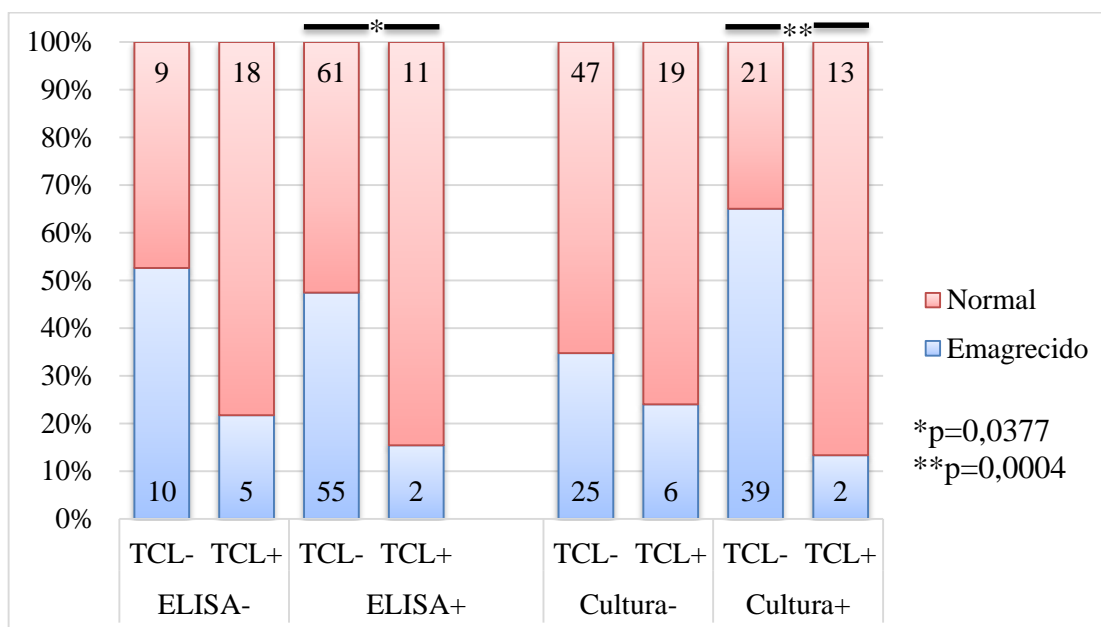
**Gráfico 1.** Distribuição de cães por ELISA, cultura esplênica e TCL

As frequências absolutas encontram-se dentro das colunas

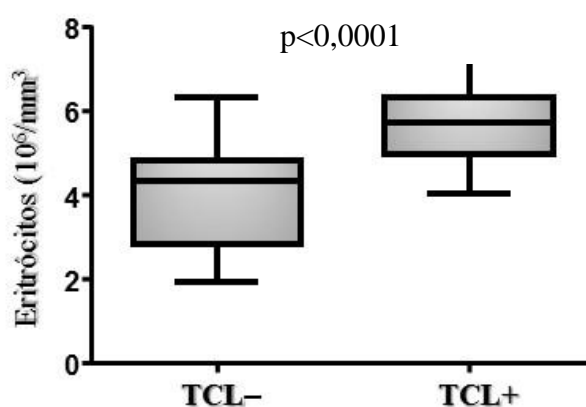
Conforme demonstrado pelo Gráfico 1, a proporção de animais soropositivos entre aqueles com cultura esplênica negativa foi maior para cães com o teste cutâneo negativo do que para os com o teste cutâneo positivo (respectivamente 82,2% e 32%;  $p<0,0001$ ). Um efeito similar foi observado entre animais com resultados de cultura positivos, já que a frequência de animais soropositivos foi maior (90,3%) em animais com teste cutâneo negativo do que no grupo com teste cutâneo positivo (46,2%;  $p=0,0009$ ). Adicionalmente, este último grupo apresenta porcentagens similares ao do com cultura negativa.

Percebeu-se também uma associação do resultado positivo no TCL e uma menor frequência de cães emagrecidos, tanto em cães soropositivos para *L. chagasi*, quanto em animais com cultura esplênica positiva, conforme demonstra o Gráfico 2.

Não foram encontradas outras diferenças entre os grupos com teste cutâneo positivo e negativo, quando analisados os demais sinais clínicos (Tabela 4).

**Gráfico 2.** Distribuição de cães conforme emagrecimento, cultura esplênica e TCL

Comparando-se o número médio de hemácias entre cães infectados com diferentes resultados de TCL, também pôde-se verificar que aqueles com TCL negativo apresentaram menor média de eritrócitos ( $4 \pm 0,2121$  milhões) do que os com TCL positivo ( $5,6 \pm 0,2432$  milhões;  $p < 0,0001$ ) (Gráfico 3). Não foram encontradas diferenças estatísticas em relação aos demais testes de bioquímica sérica ou hematológicos analisados.

**Gráfico 3.** Contagens de eritrócitos nos cães infectados

Quanto aos resultados do PCR quantitativo para carga parasitária, não se encontrou diferença estatística entre os grupos de cães com TCL negativo e positivo.

**Tabela 4.** Distribuição de sinais clínicos por ELISA, cultura e TCL

	ELISA-			ELISA+			Cultura-			Cultura +		
	TCL-	TCL+	p <sup>a</sup>	TCL-	TCL+	p <sup>a</sup>	TCL-	TCL+	p <sup>a</sup>	TCL-	TCL+	p <sup>a</sup>
<b>ELISA+</b>	-	-	-	-	-	-	60/148	8/25	ns	56/62	6/13	0,0009
<b>Cultura+</b>	6/94	7/24		56/116	6/14		-	-	-	-	-	-
<b>Emaciação</b>	42/103	5/23	ns	55/116	2/13	0,0377	53/143	6/25	ns	39/60	2/15	0,0004
<b>Dermatite</b>	17/68	0/6	ns	39/99	5/8	ns	30/103	2/11	ns	24/51	3/4	ns
<b>Alopécia</b>	28/65	3/6	ns	41/96	5/8	ns	41/98	6/11	ns	25/50	2/4	ns
<b>Anemia clínica</b>	13/48	1/5	ns	17/50	0/5	ns	13/59	1/7	ns	15/31	0/3	ns
<b>Conjuntivite</b>	8/64	1/6	ns	32/96	3/7	ns	20/98	3/10	ns	18/49	1/4	ns
<b>Desidratação</b>	2/40	1/5	ns	1/28	0/3	ns	2/49	1/7	ns	1/12	0/1	ns
<b>Erosão de pele</b>	1/43	0/5	ns	1/29	0/3	ns	2/53	0/7	ns	0/12	0/1	ns
<b>Úlcera de pele</b>	1/41	0/4	ns	3/29	2/4	ns	3/53	2/7	ns	2/12	0/1	ns
<b>Pústulas</b>	1/42	0/5	ns	1/29	0/3	ns	2/52	0/7	ns	0/12	0/1	ns
<b>Linfadenomegalia</b>	34/64	4/5	ns	44/96	1/7	ns	50/97	4/9	ns	22/50	1/4	ns
<b>Onicogribose</b>	25/66	2/6	ns	23/96	1/7	ns	28/99	3/10	ns	17/50	0/4	ns
<b>Esplenomegalia</b>	7/40	2/4	ns	23/46	3/6	ns	15/57	2/7	ns	13/23	3/3	ns

ns: não-significante; a: calculado para cada sinal clínico com base em tabelas de contingência que cruzava presença ou ausência do sinal clínico em questão com positividade ou não para o TCL.

## VI. DISCUSSÃO

Neste trabalho, o antígeno usado para se fazer o teste cutâneo de leishmanina é derivado de promastigotas de *L. chagasi*, não só por ser esta a espécie causadora mais frequente de leishmaniose visceral na área estudada, mas também, por ter sido demonstrado em outra pesquisa que a frequência de animais positivos para o teste usando esse antígeno é maior do que para as outras espécies testadas, como *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Baleeiro et al., 2006). Foi definida como melhor dose em termos de custo-benefício a aplicação intradérmica de 250 µg, que se mostrou de eficácia superior a 125 µg e semelhante a 500 µg. Em cães, outros autores também adotam metodologia semelhante, mas com diferentes concentrações de *Leishmania* para o preparo do antígeno, como  $3 \times 10^6$  (Cardoso et al., 2007) e  $3 \times 10^8$  promastigotas/ml (Rodríguez-Cortés et al., 2007; Gómez-Ochoa et al., 2009; Daneshvar et al., 2010; Todolí et al., 2010). *L. major* e *L. amazonensis* também são usadas, respectivamente nas concentrações de  $10^7$  e  $10^5$  promastigotas/ml (Werneck et al., 2014; Barati et al., 2015). É difícil comparar nossos resultados com os dos demais autores por se tratarem de populações de outras áreas endêmicas, com diferentes prevalências de infecção por leishmaniose visceral, não permitindo a transposição direta dos valores que encontramos para tais locais.

Em humanos, o teste cutâneo de leishmanina é geralmente executado usando antígeno de promastigotas de *L. amazonensis* ( $5 \times 10^7$  parasitas/ml) (Silva et al., 2011; Viana et al., 2011; Alimohammadian et al., 2012), usados numa concentração padrão de 40 µg/ml de nitrogênio proteico, conforme descrito inicialmente por Melo et al. (1977), que obteve com essa preparação 96% de sensibilidade e negatividade em todos os controles, ao estudar 100 pacientes com leishmaniose tegumentar americana e 30 indivíduos saudáveis. Um estudo indiano utilizou uma cepa de *L. major*, adotando uma concentração de antígeno de  $6 \times 10^6$  promastigotas/ml (Gidwani et al., 2009), mas  $10^7$  promastigotas/ml também é usada por alguns autores (Gavgani et al., 2002; Babuadze et al., 2014). *L. infantum* também tem sido usada na concentração de  $5 \times 10^6$  promastigotas/ml (Khalil et al., 2002; Schenkel et al., 2006; Bern et al., 2007), mas também houve trabalhos usando a concentração de  $10^6$  promastigotas/ml, sendo um deles com indivíduos infectados por HIV (EL-Safi et al., 2002; García-García et al., 2006).

Apesar de universalmente adotado, tanto em cães quanto em humanos, o ponto de corte de 5 mm para o teste cutâneo tem sido usado de forma empírica até muito recentemente. Pesquisa de Skraba et al. (2015) com 4.256 pacientes com suspeita de leishmaniose cutânea separou os indivíduos em dois grupos, sendo o positivo caracterizado por presença de lesões cutâneas e pesquisa direta para parasitos positiva, e o grupo negativo constituído por pessoas de áreas consideradas sítios prováveis de infecção com lesões de pele com menos de 2 meses de evolução, pesquisa direta para parasitos negativa e resultados de imunofluorescência negativos. Análise de curva ROC (*Receiver-Operating Characteristic*) mostrou 97,4% de sensibilidade e 93,9% de especificidade para o ponto de corte de 5 mm e 95,8% de sensibilidade e 97,1% de especificidade para 6 mm, sendo ambos os valores passíveis de serem utilizados.

Definimos 48 horas como o tempo ótimo para leitura da reação cutânea. Não foram encontrados trabalhos na literatura comparando diferentes tempos para verificar resultado do teste.

Neste trabalho, padronizamos o TCL também para o local de aplicação do antígeno. As reações tiveram um maior tamanho quando aplicadas em região de pele espessa, aqui representada pelo dorso, do que de pele fina, como a parede abdominal. Apesar disso, não encontramos diferença no número de cães positivos comparando as duas áreas, mostrando que o teste pode ser realizado em qualquer uma das duas regiões. A maior parte dos autores, entretanto, conduzem os experimentos injetando o antígeno em áreas de pele fina, como parede abdominal (Cardoso et al., 2007), região inguinal (Gomez-Ochoa et al., 2007; Rodríguez-Cortés et al., 2007; Daneshvar et al., 2010; Todolí et al., 2010) e superfície interna da orelha (Genaro et al., 1992).

Em nossa pesquisa, encontramos uma associação negativa entre o TCL e soropositividade para infecção por *Leishmania*, tanto em cães com cultura negativa quando naqueles com cultura positiva, sugerindo certo grau de polarização na resposta à infecção por *L. chagasi*.

Cardoso (2007) também avaliou resposta imune celular e humoral em cães de diferentes raças com infecção por *L. chagasi* sintomática e assintomática. Estudou níveis de IgG1 e IgG2,

correlacionando-as com resultados de teste de aglutinação direta (DAT) e com TCL, e observou uma correlação alta entre IgG2 e DAT e também entre IgG2 e presença de sintomas de leishmaniose visceral, sugerindo que essa subclasse é a principal envolvida na resposta humoral aferida pelo DAT e um marcador de doença. Entretanto, apesar de níveis menores de IgG2 em cães com TCL positivo, não houve diferença estatística ao se comparar com os cães com o teste negativo. Rodríguez-Cortés et al. (2006) não encontrou correlação entre as concentrações de anticorpos específicos e TCL, mas notaram correlação negativa entre a IgA detectada e resposta no ensaio de linfoproliferação. Outros autores encontraram resultados semelhantes ao estudar cães experimentalmente infectados, não notando associação entre resposta humoral e resposta celular (Leandro et al., 2001), sugerindo uma resposta menos fortemente polarizada dos animais estudados.

É possível que essas diferenças entre as expressões de imunidade celular e humoral observadas nos diferentes estudos seja explicável pelas diferentes raças de cães incluídos. Nosso trabalho envolveu cães de rua diversos, que podem ser diferentes dos animais analisados pelos demais autores, que mais comumente foram cães ibéricos que possuíam donos ou cães de raças específicas. Já foi demonstrado experimentalmente que algumas raças de cães, como o podengo ibicenco, produzem respostas celulares mais fortemente polarizadas, celulares, do que outras raças (Solano-Gallego et al., 2000), o que demonstra essa heterogeneidade de resposta.

Já foi demonstrado por diferentes autores a associação entre TCL e outros testes que aferem imunidade celular, e resistência à infecção por *Leishmania*, tanto em cães quanto em humanos (Cabral et al., 1992; Pinelli et al., 1994). Dessa forma, o TCL se tornou ferramenta útil para avaliar eficácia de vacinas experimentais, estado de cura após tratamento de leishmaniose visceral, e prevalência de infecção em áreas endêmicas, onde há um grande número de indivíduos e animais assintomáticos ou que controlaram eficientemente a o parasito (Gómez-Ochoa et al., 2009; Daneshvar et al., 2010; Silveira et al., 2010; Todolí et al., 2010; Viana et al., 2011). Neste estudo, verificamos uma associação negativa entre TCL e emaciação e TCL e úlceras de pele, mas não foi vista diferença estatística para as demais variáveis clínicas estudadas. É possível que isso tenha acontecido por se tratar de animais de rua, prováveis portadores de outras infecções além de *L. chagasi*, com sinais clínicos sobreponíveis aos da leishmaniose visceral. Dessa forma, apesar de alguns animais apresentarem perfil de resistência

à leishmaniose, afetado pelo TCL, eles podem ter desenvolvido alguns dos sintomas semelhantes aos que ocorrem na doença por conta de outra afecção, subestimando o poder do TCL e mascarando as diferenças entre os grupos. São necessários mais estudos longitudinais, que capazes de estabelecer relação causa e efeito, para investigar melhor as variáveis clínicas e sua relação com o TCL.

Observamos um maior número de eritrócitos entre os cães com TCL positivo, se comparados aos negativos, sem, no entanto, detectarmos diferença significativa entre os níveis de hemoglobina. Possivelmente, isso se deveu ao fato de que apenas uma parte dos cães submetidos à contagem de eritrócitos tiveram sua hemoglobina quantificada, o que pode ter interferido com a significância do resultado.

Apesar de já ter sido demonstrado associação inversa entre TCL e parasitemia (Rodríguez-Cortés et al., 2006), no nosso estudo a diferença não foi estatisticamente significativa.

## VII. CONCLUSÕES

1. As condições ótimas para execução do teste cutâneo de leishmanina foram: 250  $\mu$ g de antígeno, tempo de 48 horas para entre injeção e leitura da reação, e aplicação em região de pele fina ou espessa; e.
2. O teste cutâneo de leishmanina positivo foi negativamente associado a positividade no ELISA, emagrecimento e úlceras de pele, e diretamente associado a maiores contagens de eritrócitos.



## IX. SUMMARY

**Standardization of the leishmanin skin test in dogs and its association with clinical and laboratory variables.** Canine visceral leishmaniasis diagnosis is given by clinical, serological and parasitological tests. However, the recognition of infection dissociated from disease is harder. In such cases, polymerase chain reaction (PCR) and leishmanin skin test have been used as infection indicators. Additionally, the leishmanin skin test has been used as a resistance marker for visceral leishmaniasis development. Even so, application and interpretation of the test in dogs has not been standardized. This study was carried out using data from a previous experimental work. Our objective was to set the parameters for application and proper interpretation of leishmanin skin test in dogs. We analysed the antigen optimal dosage, the more appropriate injection site and the more adequate time before reading the reaction. Also, we tried to associate the test results with clinical and laboratory variables. For that, we obtained data of 395 dogs from Jequié-BA, an endemic area of visceral leishmaniasis, between 1997 and 2008. Animals that did not undergo skin testing, as well as those who died or fled before being evaluated were excluded, resulting in a total of 280 dogs. Records of the induration areas and clinical signs, and results of culture, serology, PCR, blood count and serological tests were collected. It was found that the best parameters for leishmanin skin test are 250 µg of antigen and 48 hours elapsed between antigen injection and reaction reading. Results obtained from application on thick and thin skin were similar. Positivity for the test were associated with lower frequency of seropositivity, weight loss and skin ulcers and higher levels of erythrocytes.

Keywords: 1. Leishmaniasis, visceral; 2. Dogs; 3. Skin tests

## X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alimohammadian MH, Jones SL, Darabi H, Riazirad F, Ajdary S, Shabani A, et al. Assessment of interferon- $\gamma$  levels and leishmanin skin test results in persons recovered for leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Jul;87(1):70-5.
2. Babuadze G, Alvar J, Argaw D, Koning HP, Iosava M, Kekelidze M, et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Georgia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Mar; 8(3): e2725.
3. Baleeiro CO, Paranhos-Silva M, dos Santos JC, Oliveira GG, Nascimento EG, de Carvalho LP, et al. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. *Vet Parasitol.* 2006 Jun 30;139(1-3):21-8.
4. Barati M, Mohebbali M, Alimohammadian MH, Khmesipour A, Keshavarz H, Akhondi B, et al. Double-Blind Randomized Efficacy Field Trial of Alum Precipitated Autoclaved *Leishmania major* (Alum-ALM) Vaccine Mixed With BCG Plus Imiquimod Vs. Placebo Control Group. *Iran J Parasitol.* 2015 Jul-Set;10(3):351-9.
5. Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Trigo J, Aguiar PH, dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004 Mar;99(2):195-7.
6. Bern C, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, Vaz L, et al. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Maio;76(5):909-14.
7. Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA

- saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine*. 2002 Set 10;20(27-28):3277-84.
8. Cabral M, O'Grady J, Alexander J. Demonstration of Leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol*. 1992 Set;14(5):531-9.
  9. Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine Leishmania-specific cellular immunity. *Vet Parasitol*. 1998 Nov 16;79(3):213-20.
  10. Cardoso L, Schallig HD, Cordeiro-da-Silva A, Cabral M, Alunda JM, Rodrigues M. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007 Maio 15;117(1-2):35-41.
  11. Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaró R, Rocha H, et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. *J Infect Dis*. 1992 Mar;165(3):535-40.
  12. Daneshvar H, Molaei MM, Kamiabi H, Burchmore R, Hagan P, Stephen Phillips R. Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum*: cellular immunity production and protection of dogs against experimental canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2010 Nov-Dez;32(11-12):722-30
  13. Dos-Santos WL, Jesus EE, Paranhos-Silva M, Pereira AM, Santos JC, Baleeiro CO, et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008 Jun 15;123(3-4):251-9.
  14. Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*. 1996 Ago;55(2):125-30.

15. EL-Safi SH, Bucheton B, Kheir MM, Musa HA, EL-Obaid M, Hammad A, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Atbara River area, eastern Sudan: the outbreak of Barbar El Fugara village (1996-1997). *Microbes Infect.* 2002 Nov;4(14):1439-47
16. García-García JA, Martín-Sánchez J, Gállego M, Rivero-Román A, Camacho A, Riera C, et al. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol.* 2006 Dez;44(12):4455-8.
17. Gavgani AS, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet.* 2002 Ago 3;360(9330):374-9.
18. Genaro O, Raso P, da Costa CA, Carvalho MD, do Amaral F, Botelho AC, et al. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992 Jan-Mar;87(1):163-4.
19. Gidwani K, Rai M, Chakravarty J, Boelaert M, Sundar S. Evaluation of leishmanin skin test in Indian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Abr;80(4):566-7.
20. Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J.* 2009 Fev;179(2):259-63.
21. Khalil EA, Zijlstra EE, Kager PA, El Hassan AM. Epidemiology and clinical manifestations of *Leishmania donovani* infection in two villages in an endemic area in eastern Sudan. *Trop Med Int Health.* 2002 Jan;7(1):35-44.
22. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol.* 1999 Maio-Jun;17(3):279-89.
23. Lainson R, Rangel E F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo*

- Cruz. 2005 Dez; 100(8):811-27.
24. Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001 Maio 30;79(3-4):273-84.
  25. Lima IS, Silva JS, Almeida VA, Junior FG, Souza PA, Lorangeira DF, et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. *PLoS One*. 2014 Fev 3;9(2):e87742.
  26. Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Hernández S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995 Out;48(3-4):209-20.
  27. Martins-Melo FR, Lima Mda S, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. *PLoS One*. 2014 Abr 3;9(4):
  28. Melo MN, Mayrink W, da Costa CA, Magalhaes PA, Dias M, Williams P, et al. [Standardization of the Montenegro antigen]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1977 Maio-Jun;19(3):161-4..
  29. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2009. Brasília (DF); 2010a.
  30. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Letalidade de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2010. Brasília (DF); 2010b.
  31. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, DF; 2014.

32. Molano I, Alonso MG, Mirón C, Redondo E, Requena JM, Soto M, et al. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003 Mar 20;92(1-2):1-13.
33. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2010 Jun 1;236(11):1184-91.
34. Paranhos-Silva M, Oliveira GG, Reis EA, de Menezes RM, Fernandes O, Sherlock I, et al. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Vet Parasitol.* 2003 Maio 30;114(2):97-111.
35. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994 Jan;62(1):229-35.
36. Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology.* 1997 Ago;115 ( Pt 2):143-56.
37. Rodríguez-Cortés A, Fernández-Bellón H, Ramis A, Ferrer L, Alberola J, Solano-Gallego L. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007 Abr 15;116(3-4):190-8.
38. Schenkel K, Rijal S, Koirala S, Koirala S, Vanlerberghe V, Van der Stuyft P, et al. Visceral leishmaniasis in southeastern Nepal: a cross-sectional survey on *Leishmania donovani* infection and its risk factors. *Trop Med Int Health.* 2006 Dez;11(12):1792-9.
39. Silva LA, Romero HD, Nogueira Nascentes GA, Costa RT, Rodrigues V, Prata A. Antileishmania Immunological Tests for Asymptomatic Subjects Living in a Visceral

Leishmaniasis-Endemic Area in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;84(2):261-266.

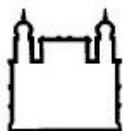
40. Silveira FT, Lainson R, Crescente JA, de Souza AA, Campos MB, Gomes CM, et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010 Ago;104(8):529-35.
41. Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, et al. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*. 2000 Jun 10;90(1-2):37-45.
42. Solano-Gallego L, Llull J, Arboix M, Ferrer L, Alberola J. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*. 2001 Dez 3;102(1-2):163-6.
43. Solcà Mda S, Guedes CE, Nascimento EG, Oliveira GG, dos Santos WL, Fraga DB, et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Vet Parasitol*. 2012 Mar 23;184(2-4):133-40.
44. Todolí F, Solano-Gallego L, de Juan R, Morell P, Núñez Mdel C, Lasa R, et al. Humoral and in vivo cellular immunity against the raw insect-derived recombinant *Leishmania infantum* antigens KMPII, TRYP, LACK, and papLe22 in dogs from an endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Dez;83(6):1287-94.
45. Townson H, Nathan MB, Zaim M, Guillet P, Manga L, Bos R, et al. Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bull World Health Organ*. 2005 Dez;83(12):942-7.
46. Viana GM, Nascimento MD, Diniz Neto JA, Rabelo EM, Binda Júnior JR, Santos Júnior OM, et al. Anti-*Leishmania* titers and positive skin tests in patients cured of kala-azar. *Braz J Med Biol Res*. 2011 Jan;44(1):62-5.

47. Werneck GL, Costa CHN, de Carvalho FAA, Pires e Cruz M do S, Maguire JH, Castro MC. Effectiveness of Insecticide Spraying and Culling of Dogs on the Incidence of *Leishmania infantum* Infection in Humans: A Cluster Randomized Trial in Teresina, Brazil. Warburg A, ed. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2014;8(10):e3172.



## XI. ANEXO 1

# PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz**

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: **004/2013**

PROJETO: "Desenvolvimento de testes baseados na resposta imune celular para identificação de cães infectados com *Leishmania* e para a definição de resistência, susceptibilidade e gravidade na leishmaniose visceral"

COORDENADOR: Dr. Washington Luis Conrado dos Santos

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Cães ( <i>Canis familiaris</i> )	172
Hamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	58

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 10/05/2013, e tem validade até 10/05/2015.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 05/10/2013, being valid until 05/10/2015.

Salvador, 14 de maio de 2013.

*Fernanda de Souza Santos*

**FERNANDA DE SOUZA SANTOS**

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ