

Eficácia de uma coleira de imidacloprida (a 10%)/flumetrina (a 4,5%) de liberação lenta para prevenção de leishmaniose canina

Emanuele Brianti^{1*}, Gabriella Gaglio¹, Ettore Napoli¹, Luigi Falsone¹, Chiara Prudente¹, Fabrizio Solari Basano², Maria S Latrofa³, Viviana D Tarallo³, Filipe Dantas-Torres^{3,4}, Gioia Capelli⁵, Dorothee Stanneck⁶, Salvatore Giannetto¹ e Domenico Otranto³

Resumo

Base: Avaliou-se a eficácia de uma coleira inseticida e repelente de liberação lenta que contém imidacloprida a 10% e flumetrina a 4,5% (Seresto, Bayer Animal Health) na prevenção de infecção por *Leishmania infantum* em uma grande população de cães que vivem em uma área hiperendêmica da Sicília (Itália).

Métodos: Inscreveu-se um total de 219 cães negativos quanto a *L. infantum* em um estudo multicêntrico controlado. Os cães foram divididos em dois grupos homogêneos, definidos como G1 (n = 102) e G2 (n = 117). Antes do início da temporada de flebotomos, os cães em G1 foram tratados com a coleira, enquanto os animais em G2 foram deixados não tratados, servindo como controles negativos. Os cães foram amostrados seriadamente nos dias D90, D180, D210 e D300 para avaliar a infecção por *Leishmania* por meio de IFAT, PCR na pele (D210-D300) e na medula óssea (D300) e citologia em aspirado da medula óssea (D300).

Resultados: Três cães (2,9%) em G1 e 41 (40,2%) em G2 se tornaram positivos quanto a *L. infantum* em pelo menos um dos testes diagnósticos empregados no estudo. O número de cães soropositivos em G2 aumentou durante o estudo de 15 (D90) para 41 (D300), com alguns deles também estando positivos em outros testes diagnósticos. Oito (19,6%) dos cães soropositivos em G2 exibiram um aumento nos títulos de anticorpos que variou de 1:160 para 1:1.280. No último acompanhamento, alguns dos cães em G2 exibiram sinais clínicos claros sugestivos de leishmaniose. A taxa de densidade de incidência média no acompanhamento final foi de 4,0% no caso de G1 e 60,7% no caso de G2, levando a uma eficácia média da coleira de 93,4% na proteção de cães em ambos os grupos.

Conclusões: Demonstrou-se que a coleira de liberação lenta testada neste estudo é segura e altamente efetiva na prevenção da infecção por *L. infantum* em uma grande população de cães. A proteção conferida por uma única coleira (por até oito meses) se estendeu por toda uma temporada de flebotomos em uma área hiperendêmica do sul da Itália. O uso regular de coleiras, pelo menos durante a temporada de flebotomos, pode representar uma estratégia confiável e sustentável para a prevenção de leishmaniose em cães que vivem em uma área endêmica ou viajam para esta.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, Cão, Leishmaniose canina, Prevenção, Controle

* Correspondência: ebrianti@unime.it

¹ Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario Annunziata, 98168 Messina, Itália

A lista completa de informações dos autores está disponível no final do artigo

Base

A leishmaniose canina (CanL), causada por protozoários do gênero *Leishmania* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*), ocorre mundialmente e é transmitida através das picadas de mosquitos-palha flebotomíneos (flebotomos) (*Diptera: Psychodidae*) [1]. *Leishmania infantum* constitui o agente etiológico mais importante de CanL e é responsável pela leishmaniose visceral e cutânea em humanos na Eurásia e América [2], com uma estimativa de 8,5/100.000 novos casos por ano nos países do sul da Europa (incluindo a Turquia) [3,4]. Nas últimas duas décadas, a doença se espalhou para o norte a partir do sul da Europa [2,5], como resultado de vários fatores, tais como alterações na distribuição dos vetores flebotomos [6], aumento do movimento de cães do Mediterrâneo para as regiões central e setentrional [7] e falta de medidas de controle efetivas [3,8]. Os cães atuam como hospedeiros reservatórios e a associação entre CanL e leishmaniose humana tem sido comprovada em áreas em que os flebotomos estão presentes [1-3]. Particularmente, cães com sinais clínicos claros atuam como o reservatório mais importante de *L. infantum* e exercem um papel importante na epidemiologia da infecção [9-11]. Portanto, embora o tratamento anti-*Leishmania* de cães infectados reduza os sinais clínicos e a carga parasitária, este não inibe completamente a infecção por meio de flebotomos [12].

Durante as últimas poucas décadas, várias tentativas têm sido feitas para melhorar as estratégias de controle e desenvolver medidas preventivas confiáveis e custo-efetivas em cães [13]. Por exemplo, vacinas recém-desenvolvidas têm demonstrado eficácia na prevenção da progressão de infecção ativa e doença [14-17]. Entretanto, a prevenção de picadas de flebotomos através do uso de compostos repelentes e inseticidas em diferentes formulações (por exemplo, *spot-on*, *spray*, coleiras impregnadas) é considerada como sendo o método mais efetivo de evitar infecção por *L. infantum* em cães [1,10,13] e, portanto, reduzindo potencialmente o risco de infecção humana [18]. Vários compostos baseados em piretroides têm demonstrado ser efetivos contra infecção por *Leishmania* em cães que vivem em áreas endêmicas [19-23]. Recentemente, licenciou-se uma coleira de matriz polimerizada que contém uma combinação de imidacloprida a 10% e flumetrina a 4,5% (Seresto®, Bayer Animal Health), doravante referida como "coleira", para uso em cães e gatos [24]. Essa coleira conferiu proteção de longo prazo (oito meses) contra carrapatos e pulgas [25,26] e foi bem-sucedida em evitar a transmissão de patógenos oriundos de carrapatos [27-29]. Embora essa coleira não esteja registrada atualmente contra flebotomos, um único estudo de campo preliminar demonstrou seu potencial para o controle de CanL em cães jovens de uma área endêmica [30]. Logo, este estudo investiga a eficácia da coleira na prevenção de infecção por *L. infantum* em cães de diferentes idades que vivem em dois abrigos bem povoados localizados em uma área hiperendêmica da bacia do Mediterrâneo.

Métodos

Declaração ética

Realizou-se um estudo multicêntrico e com controle negativo de acordo com os princípios de Boas Práticas Clínicas (VICH GL9 GCP, 2000

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004343.pdf) e a diretriz sobre Princípios Estatísticos para Estudos Clínicos Veterinários (VICH CVMP/816/00, 2000 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/01/WC500120834.pdf). O desenho do estudo e os procedimentos experimentais foram aprovados e autorizados pelo Ministério da Saúde italiano (número de autorização DGSAF/297-03/04/2012).

Locais de estudo

Os cães foram alojados em dois abrigos de animais particulares na Sicília (sul da Itália), ou seja, Messina (38,241624° N, 15,522016° E, altitude de 520 m) e Augusta (37,239034° N, 15,135016° E, altitude de 394 m), referidos como local 1 (S1) e local 2 (S2), respectivamente. Os locais de estudo estavam localizados em uma área hiperendêmica quanto a *L. infantum* [2,5], onde se descreveu a presença de vetores flebotomos competentes [31,32]. No local S1, eram abrigados aproximadamente 450 cães em 124 cercados que mediam 18,4 ou 54 m² (Figura 1). Os cães do estudo eram alojados em cercados com piso de concreto ou misto (concreto e cascalho fino), com esses cercados sendo separados por painéis de tela composta de alumínio. O local 2 abrigava aproximadamente 530 cães em 38 cercados de piso misto, com cada um destes medindo cerca de 100 m². Em S2, os cercados eram separados por tela de arame de ferro (1 x 1 cm). Em ambas as instalações, todos os cães possuíam uma área de repouso coberta adequada, com camas caninas, e uma área aberta externa. Em cada cercado, os cães tinham acesso diário a amplos cercados compartilhados e eram alimentados com ração canina seca comercial e água de torneira.

Desenho do estudo e procedimentos experimentais

Em março de 2012, antes da inscrição, triou-se um total de 455 cães (S1 = 144, S2 = 311) quanto a anticorpos anti-*L. infantum* circulantes, utilizando um teste de anticorpos imunofluorescentes indireto (IFAT) e/ou um teste ELISA rápido (ver abaixo). Apenas cães negativos na triagem foram considerados como candidatos para inclusão no estudo. Em abril-maio de 2012 (Dia 0), esses animais foram examinados fisicamente e pesados e foram coletadas amostras sanguíneas, cutâneas e de medula óssea (ver abaixo).



Figura 1. Panorama do abrigo de Messina (local S1) em que eram abrigados aproximadamente 450 cães.

Os cães que cumpriram os critérios de inclusão (saúde geral normal, ≥ 7 semanas de idade, não tratados com produtos ectoparasiticidas ou drogas imunossupressoras nos meses anteriores e negativos quanto a *L. infantum* na sorologia (IFAT), na PCR cutânea e de medula óssea e na citologia de esfregaços de medula óssea a partir de amostras coletadas no momento da inclusão) foram inscritos no estudo. Os cães incluídos foram identificados usando-se o código de *microchip* e foram designados para um dos dois grupos (G1 e G2), utilizando um plano de alocação de tratamento aleatório. A randomização foi realizada dentro dos cercados em vez de alocar cães individuais para evitar que animais de ambos os grupos ficassem em contato físico em um cercado e que o ingrediente ativo fosse possivelmente transferido dos cães tratados para os não tratados. No dia da inclusão (D0), coleiras com imidacloprida a 10% + flumetrina a 4,5% foram colocadas nos cães em G1 com base em seu peso corporal (ou seja, coleira pequena: < 8 kg/coleira grande: > 8 kg), enquanto os cães em G2 foram deixados sem tratar e serviram como controles negativos.

Os animais foram acompanhados nos dias 90, 180, 210 e 300 após a inclusão. Após cada acompanhamento, os cães eram fisicamente examinados e amostras sanguíneas, cutâneas e de medula óssea eram coletadas, como mostrado na Tabela 1. As coleiras foram usadas dos dias 0 a 210 e só foram substituídas se tivessem sido perdidas ou se o peso do animal tivesse aumentado acima do limiar de 8 kg. As coleiras foram removidas dos cães no grupo G1 no dia 210 e não foram substituídas. Todos os cães incluídos no estudo foram observados diariamente quanto a qualquer alteração em sua saúde. Não se permitiu o uso de outros ectoparasiticidas nos cães ou no ambiente por todo o período de estudo. No entanto, tratamentos individuais foram autorizados quando ocorreram fortes infestações por carrapatos ou pulgas. Devido à natureza do produto veterinário em investigação (coleira), o cegamento só foi aplicável para o pessoal que realizou as análises laboratoriais.

Amostragem e procedimentos diagnósticos

Amostras sanguíneas de aproximadamente 5 mL foram coletadas em tubos de vácuo a partir da veia braquial ou jugular, foram imediatamente transferidas para armazenamento resfriado ($+4^{\circ}\text{C}$), foram deixadas em repouso para coagular e foram centrifugadas (1.700 rpm por 10 minutos). O soro resultante foi coletado em microtubos individuais. As amostras de tecido cutâneo (cerca de $0,5\text{ cm}^2$) foram coletadas a partir da região interescapular e foram armazenadas em microtubos individuais que continham 1 mL de solução PBS (solução salina-tampão de fosfato). A medula

óssea foi amostrada por meio de uma técnica de aspiração a partir da crista ilíaca utilizando agulhas Rosenthal (calibre 16 ou 18) e foi armazenada da mesma forma que as amostras sanguíneas e cutâneas. Além disso, as amostras de medula óssea foram aplicadas como esfregaço em lâminas para exame citológico quanto a amastigotos de *L. infantum*. Os microtubos contendo amostras séricas, cutâneas e de medula óssea foram armazenados a -20°C até a análise.

As amostras séricas foram testadas quanto a anticorpos anti-*L. infantum* circulantes por meio de IFAT, utilizando um corte de 1:80, conforme descrito em outro local [23]. Os soros positivos também foram titulados usando-se diluições seriadas até ficarem negativos. Além disso, a fim de reduzir o risco de incluir cães potencialmente infectados, as amostras séricas coletadas na triagem preliminar foram testadas usando-se 1:40 como corte. Realizou-se uma PCR para amplificação do DNA de *Leishmania* em amostras cutâneas e de medula óssea. Extraiu-se o DNA total utilizando o *Genomic DNA Purification Kit* (Gentra Systems, Minnesota, EUA) e o *QIAampDNA Micro Kit* (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemanha), respectivamente, e amplificou-se um fragmento do minicírculo de DNA do cinetoplasto de *L. infantum* utilizando o *kit* de *primer* de MC1/MC2 [33]. Os amplicons foram redissolvidos em géis de agarose corados com brometo de etídio (a 2%) (Gellyphor, Itália) e dimensionados por meio de comparação com marcadores na *Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder* (MBI Fermentas, Lituânia). Os géis foram fotografados usando-se um sistema de documentação digital (Gel Doc 2000, BioRad, Reino Unido). Os esfregaços de medula óssea foram corados com *MGG Quick Stain* (Bio-Optica, Itália) e examinados microscopicamente quanto a amastigotos de *L. infantum*. Cada esfregaço foi examinado por cerca de 10 minutos sob microscopia luminosa (100 campos microscópicos), utilizando uma objetiva de imersão em óleo de 100x.

Pesquisa entomológica da atividade de flebótomos

Armadilhas luminosas foram usadas para avaliar a espécie e a atividade dos flebótomos nos abrigos investigados. Começando a partir de maio de 2012, duas armadilhas eram colocadas quinzenalmente em cada abrigo, a 50 cm acima do solo, antes do pôr-do-sol (6:00 da tarde) e deixadas *in situ* por 12 horas (6:00 da manhã) [32]. Suspendeu-se a atividade de monitoramento após três procedimentos negativos consecutivos. Os flebótomos capturados e agrupados por abrigo e dia de coleta foram contados e as espécies foram identificadas usando-se chaves morfológicas [34,35].

Tabela 1. Calendário do estudo e amostras coletadas nas visitas programadas a partir de cães triados/incluídos

Dia do estudo	Data	Exame físico	Coleira	Sangue	Pele	Medula óssea
Triagem Preliminar	março-abril/2012	+	-	+	-	-
Inclusão (D0)	abril-maio/2012	+	Aplicação	+	+	+
Acompanhamento I (D90 \pm 10)	julho-agosto/2012	+	-	+	-	-
Acompanhamento II (D180 \pm 10)	outubro-novembro/2012	+	-	+	-	-
Acompanhamento III (D210 \pm 10)	novembro-dezembro/2012	+	Remoção	+	+	-
Acompanhamento IV (D300 \pm 10)	fevereiro-março/2013	+	-	+	+	+

Análise estatística

O tamanho de amostra mínimo por grupo (n = 107) foi determinado por Win-Episcope 2.0 [36], com base em uma incidência esperada de 1 e 10% em G1 e G2, respectivamente (potência = 90% e nível de confiança = 95%). A homogeneidade dos grupos foi calculada retrospectivamente nas características basais no dia 0 (tais como sexo, idade, comprimento do pelame e peso corporal) utilizando um teste do qui-quadrado ou um teste exato de Fisher no caso de dados qualitativos (sexo, comprimento do pelame) e uma análise de variância (ANOVA) no caso de dados quantitativos (idade e peso). Como o objetivo do estudo foi definir a eficácia do tratamento na prevenção de infecção por *L. infantum*, os cães negativos foram definidos como aqueles que foram negativos em qualquer um dos testes diagnósticos usados (IFAT, PCR dos tecidos cutâneo e da medula óssea, citologia de aspirado de medula óssea) por todo o estudo. A avaliação de eficácia foi baseada na comparação da incidência de cães infectados por *L. infantum* nos dois grupos de tratamento. A incidência foi calculada como sendo a incidência bruta anual (ou seja, considerando apenas os resultados da amostragem final, independentemente do que ocorreu no período) como segue: incidência bruta anual = número de cães recém-infectados por *L. infantum* / (número de cães negativos inicialmente inscritos - número de cães perdidos ou mortos) x 100. Para superar o problema dos cães perdidos no acompanhamento durante o estudo, também se calculou a incidência de infecção usando a taxa de densidade de incidência (IDR) [37]. Foram calculadas IDR em cada acompanhamento, como sendo o número de cães recém-infectados em qualquer teste diagnóstico, dividido pelo número de cães-meses de acompanhamento (ou seja, o número de meses entre as avaliações anterior e atual para cada cão em risco de infecção por *L. infantum*). Os cães testados apenas uma vez (por exemplo, perdidos, mortos) não contribuíram em nenhum momento para o cálculo da incidência. Depois, as IDR finais foram expressas por ano.

A eficácia (%) da coleira na prevenção de infecção por *L. infantum* foi calculada usando-se esta fórmula: % de proteção = (% de cães positivos no grupo G2 - % de cães positivos no grupo G1) / (% de cães positivos no grupo G2) x 100. A porcentagem de cães positivos foi calculada como a IDR. A significância da eficácia (ou seja, a significância da diferença entre as IDR nos cães com e sem coleira) foi testada usando-se o teste do qui-quadrado.

Resultados

Na triagem preliminar, 355 (78%) dos 455 cães testaram como sendo sorologicamente negativos quanto a anticorpos anti-*L. infantum* circulantes (Tabela 2). A porcentagem de cães soropositivos foi mais alta ($p > 0,05$) em S2 (25,4%; 79/311) do que em S1 (14,6%; 21/144). No Dia 0, estavam inscritos 279 (G1 = 135, G2 = 144) cães; no entanto, 60 (G1 = 33, G2 = 27) foram

excluídos do estudo por terem sido positivos na sorologia e/ou na PCR nas amostras coletadas no dia 0 (G1 = 26, G2 = 22), por terem relutado em manter a coleira (G1 = 3), por terem sido dados em adoção (G2 = 1), por terem morrido antes da primeira visita de acompanhamento (G1 = 2, G2 = 4) ou por terem um histórico de leishmaniose relatado (G1 = 2). Consequentemente, manteve-se um total de 219 (G1 = 102, G2 = 117) cães no estudo, que foram incluídos no cálculo da eficácia. Esses cães foram homogeneamente distribuídos ($p > 0,05$) com relação a sexo, comprimento de pelame, idade e peso (Tabela 3). No decorrer do estudo, 29 (G1 = 16, G2 = 13) foram perdidos no acompanhamento em diferentes pontos de checagem devido a um resultado fatal de agressões (brigas) (G1 = 11, G2 = 12), insuficiência renal (G2 = 1) ou exclusão por terem perdido a coleira mais de 3 vezes (G1 = 5).

Tabela 2. Resultados da triagem quanto à presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum* circulantes

	Local de estudo	
	Messina (S1)	Augusta (S2)
Número de animais triados	144	311
Média de idade (meses)/variação	48,5/3-108	38,1/2-120
Comprimento do pelame (%) curto/médio/longo	50,0/35,4/14,6	52,7/35,6/11,7
Sexo (%) feminino/masculino	52,8/47,2	60,8/39,2
ELISA positivo	15/144 (10,4%)	33/311 (10,6%)
IFAT positivo	11/50 (22,0%)	69/268 (25,7%)
ELISA e/ou IFAT positivos	21/144 (14,6%)	79/311 (25,4%)

Nos animais tratados, as coleiras eram trocadas se o peso do cão aumentasse acima do limiar de 8 kg (n = 8) ou porque estas foram danificadas ou perdidas uma (n = 10) ou mais (n = 3) vezes.

Globalmente, três cães (2,9%) em G1 e 47 (40,2%) em G2 testaram positivamente quanto a *L. infantum* em pelo menos um dos testes diagnósticos empregados no estudo. O número de cães soropositivos em G2 aumentou no decorrer do estudo de 15 (primeiro acompanhamento) para 41 (quarto acompanhamento), com alguns deles (n = 19; 40,4%) também sendo positivos na PCR em pele e/ou medula óssea e/ou na citologia em aspirado de medula óssea (Tabela 4). Todos os cães, exceto quanto a um que apresentou uma soroconversão inicial, permaneceram positivos até o final do estudo. Oito dos cães soropositivos (19,6%) em G2 exibiram aumento nos títulos de anticorpos que variaram de 1:160 para 1:1.280. Dentre os cães soropositivos em G1, descobriu-se que dois eram positivos desde o segundo acompanhamento, enquanto o terceiro testou sorologicamente de forma positiva no último acompanhamento (Tabela 4). No último acompanhamento, alguns dos cães positivos em G2 exibiram sinais clínicos claros sugestivos de CanL, com aumento de volume linfonodal (n = 28; 68,3%) e dermatite esfoliativa seca (n = 6; 14,6%) sendo os sinais mais frequentes (Figura 2).

Tabela 3. Características dos cães incluídos no estudo

	Todos os locais			Messina (S1)		Augusta (S2)	
	G1	G2	Total	G1	G2	G1	G2
Número de cães incluídos	102	117	219	35	38	67	79
Média de idade (meses)/variação	30,7/2-96	29,5/2-84	30,1/2-96	29,9/3-84	31,3/3-72	31,1/2-96	28,6/2-84
Sexo (%) feminino/masculino	55,9/44,1	65,0/35,0	60,7/39,3	60,0/40,0	52,6/47,4	53,7/46,3	70,9/29,1
Peso (kg)/variação	19,3/3,8-41	19,2/4,1-47	19,3/3,8-41	19,6/7,5-41	21,5/6,9-47	19,2/3,8-35	18,1/4,1-38
Comprimento de pelame (%)							
Curto	55,8	53,0	54,3	51,5	50,0	58,2	54,4
Médio	32,3	35,0	33,8	28,5	36,8	34,3	34,1
Longo	11,9	12,0	11,9	20,0	13,2	7,5	11,5

A incidência bruta anual calculada usando-se cães que permaneceram no estudo até o último acompanhamento programado (D300) foi de 3,5% (3/86) e (39,4%) (41/104) nos casos de G1 e G2, respectivamente ($p < 0,001$). As IDR para cada grupo em cada acompanhamento estão exibidas na Tabela 5. A IDR média no acompanhamento final foi de 4,0% no caso de G1 e 60,7% no caso de G2. Por isso, a eficácia média da coleira na proteção de cães contra infecção por *L. infantum* foi de 93,4% ($p < 0,01$), variando de 90,5 a 100% nos locais S1 e S2, respectivamente. Não foram observados eventos adversos ou efeitos colaterais relacionados às coleiras nos cães tratados. Foram registradas infecções graves por carrapatos em 38 cães em G2; esses animais foram tratados individualmente por meio de remoção manual ($n = 17$) ou com um produto ectoparasiticida individual não repelente, ou seja, Frontline[®] spot-on, Merial SAS ($n = 21$).

Flebótomos ($n = 700$) foram capturados do final de maio de 2012 até a primeira semana de novembro de 2012 (S1) e do final de junho até outubro (S2). Em ambos os locais, *Sergentomyia minuta* foi a espécie mais bem representada (433 fêmeas e 83 machos; 73,7%), seguido por *Phlebotomus perniciosus* (84 machos e 35 fêmeas, 16,9%), *Phlebotomus perfiliewi* (42 fêmeas e 13 machos; 7,9%) e *Phlebotomus neglectus* (7 fêmeas e 2 machos; 1,3%). Capturou-se uma única fêmea de *Phlebotomus sergenti* no local S2. O maior número ($n = 327$) de flebótomos foi capturado em setembro, enquanto a maioria dos espécimes de *P. perniciosus* foi coletada em agosto ($n = 21$), setembro ($n = 40$) e outubro ($n = 25$), respectivamente.

Discussão

A coleira de liberação lenta testada neste estudo provou ser segura e altamente efetiva (eficácia média no acompanhamento final = 93,4%) na prevenção de infecção por *L. infantum* em cães que viviam em uma área hiperendêmica quanto a CanL. Um único estudo de campo preliminar sugeriu o alto potencial dessa coleira na prevenção de CanL em cães jovens jamais expostos a uma temporada de transmissão [30]. No presente estudo, confirmamos e ampliamos esse conhecimento ao testar a coleira em uma população de cães maior e heterogênea em uma área hiperendêmica quanto a CanL. A hiperendemicidade de ambos os locais de estudo foi confirmada pela incidência anual (39,4%) e pela IDR média (60,7%) registrada nos cães controle no último acompanhamento, que são as mais altas já registradas no sul da Itália [19-21,23,30,38-40]. Isso pode se dever à presença simultânea de animais doentes e cães não protegidos suscetíveis nos dois abrigos, junto com a presença de espécies competentes de flebótomos. Além disso, de acordo com os resultados da

triagem preliminar, um grande número de cães aparentemente saudáveis, porém soropositivos, estava presente em ambos os locais de estudo (S1 = 14,6%; 21/144 e S2 = 25,4% 79/311).

No decorrer do estudo, um total de 47 (40,2%) dos 117 cães sem coleira testaram positivamente pelo menos em uma das quatro investigações de acompanhamento. A maioria desses cães só estava positiva na sorologia, enquanto outros ($n = 19/47$; 40,4%) exibiam uma infecção ativa, testando positivamente de forma simultânea por meio de diferentes métodos diagnósticos (sorologia, PCR e citologia). O status de infecção ativa também foi corroborado pelo aumento nos títulos de anticorpos registrado em oito cães (19,6%). Sabe-se que, uma vez estabelecida em cães, a infecção por *L. infantum* progride por um período variável de tempo através de diferentes apresentações clínicas [7,38,40], embora, nos 12 meses pós-infecção, a maioria dos cães não exiba uma afecção clínica [40]. De acordo com isso, no presente estudo, embora aumento de volume linfonodal tenha sido o sinal clínico mais frequentemente encontrado (68,3%) nos cães sorologicamente positivos, outros sinais (tais como dermatite esfoliativa seca e perda de peso) foram observados no último acompanhamento em 14,6 e 2,4% dos cães, respectivamente.

Entre os cães com coleira, apenas três animais se tornaram soropositivos quanto a *L. infantum*. Embora soropositivos, esses animais não exibiam sinais clínicos sugestivos de CanL. Esses três cães estavam alojados no local S2, onde se registrou a IDR mais alta da infecção (63,9%) nos cães controle no último acompanhamento. Isso pode explicar a alta pressão parasitária no local S2, que levou finalmente a uma porcentagem de proteção abaixo de 100%. Aceita-se que o mecanismo pelo qual a coleira protege cães contra infecção por *Leishmania* é o efeito antialimentação dos insetos da flumetrina, que reduz o número de picadas de flebótomos e, por sua vez, o desafio da infecção [30]. Da mesma forma, tem-se demonstrado que um pequeno número de flebótomos pode se alimentar efetivamente em cães com coleira, como foi mostrado em um estudo com cães que usavam coleiras impregnadas com deltametrina [41]. Entretanto, a maior parte dos flebótomos que se alimentaram em cães com coleira morrerá em poucas horas [41]. Logo, pode-se concluir que, mesmo que alguns cães com coleira possam se infectar se forem picados por um flebótomo infectado, dificilmente contribuirão para a transmissão da infecção para outros cães. De fato, a maior parte dos flebótomos será repelida quando entrar em contato com um cão com coleira, e os poucos que forem capazes de se alimentar nesses cães morrerão logo depois disso.

Tabela 4. Resultados dos testes diagnósticos registrados no acompanhamento dos cães em ambos os grupos (G1 = tratados e G2 = controle) que se tornaram positivos quanto a *Leishmania infantum* em pelo menos um teste/acompanhamento

Grupo	Identidade/ Local	Acompanhamento I (julho-agosto/2012)	Acompanhamento II (outubro-novembro/2012)	Acompanhamento III (novembro-dezembro/2012)		Acompanhamento IV (fevereiro-março/2013)			
		Sorologia	Sorologia	Sorologia	PCR em pele	Sorologia	PCR em pele	PCR em medula óssea	Citologia
G1	042/S2	negativa	negativa	negativa	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G1	261/S2	negativa	1:80	1:160	negativa	1:160	negativa	negativa	positiva
G1	310/S2	negativa	1:80	1:320	negativa	1:320	negativa	negativa	positiva
G2	073/S2	1:80	1:80	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	081/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	positiva	negativa	positiva
G2	083/S2	1:80	-	-	-	-	-	-	-
G2	086/S2	negativa	1:80	1:80	negativa	1:80	negativa	positiva	positiva
G2	092/S2	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
G2	093/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	positiva
G2	106/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	positiva
G2	109/S2	1:80	1:80	1:80	negativa	1:80	positiva	negativa	negativa
G2	111/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	positiva
G2	112/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	positiva	negativa	positiva
G2	140/S2	1:80	1:80	1:80	negativa	1:80	positiva	negativa	positiva
G2	142/S2	1:80	-	-	-	-	-	-	-
G2	157/S2	1:80	-	-	-	-	-	-	-
G2	158/S2	1:80	1:80	1:160	positiva	1:1.280	positiva	negativa	negativa
G2	163/S2	negativa	negativa	1:80	positiva	1:160	positiva	negativa	negativa
G2	164/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	168/S2	negativa	negativa	negativa	negativa	1:80	positiva	negativa	negativa
G2	173/S2	1:80	1:80	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	175/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	-	-	-	-
G2	177/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	178/S2	negativa	negativa	negativa	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	179/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:160	negativa	negativa	positiva
G2	192/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	201/S2	negativa	negativa	1:80	positiva	1:160	negativa	positiva	negativa
G2	204/S2	1:80	1:80	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	208/S2	1:80	1:80	1:80	negativa	1:80	positiva	negativa	negativa
G2	216/S2	1:80	1:80	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	237/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa

Tabela 4. Resultados dos testes diagnósticos registrados no acompanhamento dos cães em ambos os grupos (G1 = tratados e G2 = controle) que se tornaram positivos quanto a *Leishmania infantum* em pelo menos um teste/acompanhamento (Continuação)

G2	272/S2	1:80	1:80	1:160	negativa	1:160	negativa	negativa	negativa
G2	273/S2	1:80	1:80	1:160	negativa	-	-	-	-
G2	277/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	298/S2	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	018/S1	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	021/S1	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	022/S1	negativa	negativa	1:160	positiva	1:160	negativa	negativa	negativa
G2	051/S1	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	062/S1	negativa	negativa	negativa	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	063/S1	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	064/S1	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	065/S1	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	positiva
G2	087/S1	1:80	1:80	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	positiva
G2	100/S1	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	101/S1	negativa	negativa	negativa	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	139/S1	1:80	1:160	1:320	negativa	1:320	negativa	negativa	negativa
G2	140/S1	negativa	negativa	negativa	negativa	1:80	negativa	negativa	negativa
G2	143/S1	negativa	negativa	1:160	positiva	1:320	positiva	negativa	negativa
G2	144/S1	negativa	negativa	1:80	negativa	1:80	positiva	negativa	negativa

No caso da sorologia (IFAT), relata-se o título de diluição mais alto.



A eficácia porcentual da coleira que continha imidacloprida (a 10%) e flumetrina (4,5%) contra infecção por *L. infantum* registrada em cães jovens (100%) [30] ou no presente estudo (93,4%) é mais alta que a obtida se usando uma coleira impregnada com deltametrina, que resultou em um máximo de 86% após duas temporadas consecutivas no sul da Itália [19,20]. Isso pode se dever ao efeito residual mais longo da coleira com imidacloprida/flumetrina (até 8 meses) do que com a coleira com deltametrina (até 5 meses) como resultado do mecanismo de liberação lenta do primeiro dispositivo. No presente estudo, os cães tratados usaram a coleira por até oito meses (de maio a dezembro). De acordo com isso, as espécies de flebótomo que são vetores competentes de *L. infantum* (*P. perniciosus*, *P. perfiliewi* e *P. neglectus*) foram capturadas de junho a outubro e de maio a novembro nos locais S1 e S2, respectivamente. A captura de um espécime único de *P. sergenti* em S2 também

tem interesse, considerando que essa espécie está envolvida na transmissão de *Leishmania tropica*, o agente etiológico da leishmaniose cutânea humana no Oriente Médio e na África [2].

Apesar do período prolongado no qual as coleiras foram usadas e da tipologia dos animais tratados (ou seja, animais abrigados vivendo em cercados coletivos separados por telas de arame de ferro), não foram registrados efeitos colaterais ou acidentes durante o estudo. A porcentagem (22,5%) de reposições de coleira observada no estudo é semelhante à relatada em uma investigação anterior que envolveu a mesma coleira [30]. De fato, os cães que perderam a coleira eram predominantemente jovens e provavelmente animais bem vivos e brincalhões.

Conclusões

A coleira de liberação lenta que contém uma combinação de imidacloprida a 10% e flumetrina a 4,5% testada neste estudo provou ser segura e altamente efetiva (90,5-100%) na prevenção de infecção por *L. infantum* em um grupo grande e heterogêneo de cães. A proteção rotulada conferida por uma única coleira (oito meses) se estendeu por uma temporada de flebótomos inteira na área examinada, onde os flebótomos competentes ficam ativos de maio a novembro. Portanto, o uso regular de coleiras, pelo menos durante a temporada de flebótomos, pode ser considerado como sendo uma estratégia confiável e sustentável para o controle de leishmaniose em cães que vivem em uma área endêmica quanto a CanL ou viajam para esta.

Tabela 5. Taxa de densidade de incidência de leishmaniose em cães com coleira (G1) e controle sem coleira (G2) calculada para cada acompanhamento no estudo

Dia do estudo	Número de cães na coorte		Número de novos casos		Cães-meses de acompanhamento		Taxa de densidade de incidência/ano	
	G1 (Local S1/ Local S2)	G2 (Local S1/ Local S2)	G1 (Local S1/ Local S2)	G2 (Local S1/ Local S2)	G1 (Local S1/ Local S2)	G2 (Local S1/ Local S2)	G1 (Local S1/ Local S2)	G2 (Local S1/ Local S2)
Inclusão (D0)	102 (35/67)	117 (38/79)	-	-	-	-	-	-
Acompanhamento I (D90 ± 10)	102 (35/67)	117 (38/79)	0 (0/0)	15 (2/13)	299,9 (97,7/202,3)	341,6 (103,4/238,6)	0,0 (0,0/0,0)	52,7 (23,2/65,4)
Acompanhamento II (D180 ± 10)	91 (30/61)	100 (36/64)	2 (0/2)	2 (0/2)	273,9 (91,8/182,4)	308,0 (115,9/192,0)	8,8 (0,0/13,2)	7,8 (0,0/12,6)
Acompanhamento III (D210 ± 10)	86 (30/56)	95 (36/59)	0 (0/0)	25 (10/15)	81,7 (29,1/52,1)	89,3 (34,9/55,5)	0,0 (0,0/0,0)	336,0 (343,6/324,6)
Acompanhamento IV (D300 ± 10)	84 (30/54)	67 (26/41)	1 (0/1)	5 (3/2)	242,8 (87,0/155,5)	190,3 (75,4/115,2)	4,9 (0,0/7,7)	31,5 (47,8/20,8)
Total			3	47 (15/32)	898,3 (305,6/592,3)	929,2 (329,6/601,3)	4,0 (0,0/6,1)	60,7 (54,6/63,9)

Local S1 = abrigo de Messina; Local S2 = abrigo de Augusta.

Interesses conflitantes

DS é funcionária da Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Alemanha. A ARCOBLU S.R.L. é uma organização de pesquisa por contrato independente, que foi contratada para administrar e monitorar o estudo. FSB é o gerente de projeto da ARCOBLU S.R.L. Todos os autores publicam este artigo voluntariamente e não possuem interesse pessoal neste estudo além de publicar os achados científicos.

Contribuições dos autores

EB, DO, FDT, DS e FSB conceberam e desenharam a pesquisa. EB, GG, EN, LF, CP, VDT e MSL realizaram a pesquisa de campo e o trabalho laboratorial. GG realizou o estudo entomológico. FSB monitorou o estudo. FSB e GC realizaram a análise estatística dos dados. EB e DO redigiram a primeira versão do manuscrito. Todos os autores contribuíram para a revisão do manuscrito e aprovaram sua versão final.

Agradecimentos

Agradecemos a Sebastiano Ficara e Raimondo Gissara, da autoridade sanitária local (*Dipartimento Veterinario ASP 8*, Siracusa) por seu trabalho com os procedimentos administrativos do estudo. Os autores agradecem à equipe dos abrigos de animais e aos veterinários Giuseppe Cicero (clínico em Augusta) e Alessandro Taormina (clínico em Messina), que participaram deste estudo. Agradecemos ao pessoal da Arcoblu pela coordenação do projeto.

Detalhes dos autores

¹ *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario Annunziata*, 98168 Messina, Itália. ² Arcoblu s.r.l., Via Alessandro Milesi 5, 20133 Milão, Itália. ³ *Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari*, Strada Provinciale per Casamassima, 70010 Valenzano, Bari, Itália. ⁴ Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Brasil. ⁵ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Parassitologia*, Legnaro, Itália. ⁶ Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Alemanha.

Recebido: 31 de maio de 2014 Aceito: 30 de junho de 2014

Publicado: 14 de julho de 2014

Referências

- Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D: **Canine leishmaniosis in the old and new worlds: unveiled similarities and differences.** *Trends Parasitol* 2012, **28**:531-538.
- Gramiccia M, Gradoni L: **The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control.** *Int J Parasitol* 2005, **35**:1169-1180.
- Dujardin JC, Campino L, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbek Y, Boelaert M: **Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:1013-1018.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M: **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** *PLoS ONE* 2012, **7**:e35671.
- Gramiccia M: **Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis.** *Vet Parasitol* 2011, **181**:23-30.
- Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L: **The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors.** *Trop Med Int Health* 2008, **13**:256-264.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L: **Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one.** *Trends Parasitol* 2008, **24**:324-330.
- Dujardin JC: **Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring?** *Trend Parasitol* 2006, **22**:4-6.
- Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES: **Infectivity of seropositive dogs, showing different**

clinical forms of leishmaniasis to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* 2007, **147**:67-76.

- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G: **Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two.** *Trends Parasitol* 2008, **24**:371-377.
- Otranto D, Paradies P, de Caprariis D, Stanneck D, Testini G, Grimm F, Deplazes P, Capelli G: **Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic.** *Clin Vaccine Immunol* 2009, **16**:337-343.
- Miró G, Gálvez R, Fraile C, Descalzo MA, Molina R: **Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments.** *Parasit Vectors* 2011, **4**:52.
- Otranto D, Dantas-Torres F: **The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health.** *Trends Parasitol* 2013, **29**:339-345.
- Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, Xu Z, Chu HJ, Palatnik-de-Sousa CB, Luvizotto MC: **Leishmune 1 vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasite in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs.** *Vaccine* 2005, **23**:4805-4810.
- Palatnik-de-Sousa CB, Silva-Antunes I, Morgado Ade A, Menz I, Palatnik M, Lavor C: **Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas.** *Vaccine* 2009, **27**:3505-3512.
- Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM, Gueguen S: **Use of a LiESP/QA-21 vaccine (Canileish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs.** *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**:e1683.
- Moreno J, Vouldoukis I, Schreiber P, Martin V, McGahie D, Gueguen S, Cuisinier AM: **Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (Canileish[®]) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later.** *Vet Immunol Immunopathol* 2014, **158**:199-207.
- Gavagni AS, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR: **Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**:511-515.
- Maroli M, Mizzon V, Siragusa C, D'Orazi A, Gradoni L: **Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in Southern Italy.** *Med Vet Entomol* 2001, **15**:358-363.
- Foglia Manzillo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L: **Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs.** *Vet Parasitol* 2006, **142**:142-145.
- Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G, Stanneck D: **Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area.** *Vet Parasitol* 2007, **144**:270-278.
- Ferroglio E, Poggi M, Trisciungoglio A: **Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention.** *Zoonoses Publ Health* 2008, **55**:145-148.
- Otranto D, de Caprariis D, Lia RP, Tarallo V, Lorusso V, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa S, Diniz PP, Mencke N, Maggi RG, Breitschwerdt E, Capelli G, Stanneck D: **Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study.** *Vet Parasitol* 2010, **172**:323-332.
- Stanneck D, Ebbinghaus-Kintscher U, Schoenhense E, Kruedewagen EM, Turberg A, Leisewitz A, Jiritschka W, Krieger KJ: **The synergistic action of imidacloprid and flumethrin and their release kinetics from collars applied for ectoparasite control in dogs and cats.** *Parasit Vectors* 2012, **5**:73.
- Stanneck D, Rass J, Radeloff I, Kruedewagen E, Le Sueur C, Hellmann K, Krieger K: **Evaluation of the long-term efficacy and safety of an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto[®]) in dogs and cats naturally infested with fleas and/or ticks in multicentre clinical field studies in Europe.** *Parasit Vectors* 2012, **5**:66.

26. Brianti E, Falsone L, Napoli E, Prudente C, Gaglio G, Giannetto S: **Efficacy of a combination of 10% imidacloprid and 4.5% flumethrin (Seresto®) in slow release collars to control ticks and fleas in highly infested dog communities.** *Parasit Vectors* 2013, **6**:210.
27. Dantas-Torres F, Capelli G, Giannelli A, Ramos RA, Lia RP, Cantacessi C, de Caprariis D, De Tommasi AS, Latrofa MS, Lacasella V, Tarallo VD, Di Paola G, Quorollo B, Breitschwerdt E, Stanneck D, Otranto D: **Efficacy of an imidacloprid/flumethrin collar against fleas, ticks and tick-borne pathogens in dogs.** *Parasit Vectors* 2013, **6**:245.
28. Fourie JJ, Stanneck D, Jongejan F: **Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs treated with an imidacloprid/flumethrin collar.** *Vet Parasitol* 2013, **192**:273-278.
29. Stanneck D, Fourie JJ: **Imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% collars (Seresto®, Bayer) successfully prevent long-term transmission of *Ehrlichia canis* by infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs.** *Parasitol Res* 2013, **112**:21-32.
30. Otranto D, Dantas-Torres F, de Caprariis D, Di Paola G, Tarallo VD, Latrofa MS, Lia RP, Annoscia G, Breitschwerdt EB, Cantacessi C, Capelli G, Stanneck D: **Prevention of canine leishmaniasis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin.** *PLoS One* 2013, **8**:e56374.
31. Gómez-Saladín E, Doud CW, Maroli M: **Short report: surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:138-141.
32. Gaglio G, Brianti E, Napoli E, Falsone L, Dantas-Torres F, Tarallo VD, Otranto D, Giannetto S: **Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis.** *Acta Trop* 2014, **133**:73-77.
33. Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L: **PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004, **98**:12-17.
34. Killick-Kendrick R, Tang Y, Killick-Kendrick M, Sang DK, Sirdar MK, Ashford RW, Schorscher J, Johnson RH: **The identification of female sandflies of the subgenus *Larrousius* by the morphology of the spermathecal ducts.** *Parassitologia* 1991, **33**:335-347.
35. Romi R, Khoury C, Bigiocchi F, Maroli M: *Schede Guida su Acari e Insetti di Interesse Sanitario*. Roma: Rapporti Istituzionali 94/8; 1994.
36. Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K: **WI N EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine.** *Vet Rec* 2001, **148**:567-572.
37. Moreira ED Jr, de Souza VM M, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes de Carvalho L: **Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamic of canine *Leishmania* transmission.** *Vet Parasitol* 2004, **6**:245-252.
38. Oliva G, Scalone A, Foglia-Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L: **Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:1318-1322.
39. Paradies P, Capelli G, Cafarchia C, de Caprariis D, Sasanelli MT, Otranto D: **Incidence of canine leishmaniasis in an endemic area of Southern Italy.** *J Vet Med B* 2006, **53**:295-298.
40. Foglia Manzillo V, Di Muccio T, Cappiello S, Scalone A, Paparcone R, Fiorentino E, Gizzarelli M, Gramiccia M, Gradoni L, Oliva G: **Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*.** *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7**:e2225.
41. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP: **Protection of dogs from the bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for the control of canine leishmaniasis.** *Med Vet Entomol* 1997, **11**:105-111.

doi:10.1186/1756-3305-7-327

Cite este artigo como: Brianti *et al.*: Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2014 **7**:327.

Envie seu próximo manuscrito para a BioMed Central e tenha total vantagem de:

- Submissão *online* conveniente
- Revisão por pares completa
- Sem restrições de espaço ou taxas para figuras coloridas
- Publicação imediata após a aceitação
- Inclusão em PubMed, CAS, Scopus e Google Scholar
- Pesquisa que fica facilmente disponível para redistribuição

Submeta seu manuscrito em
www.biomedcentral.com/submit

