



Prevenção de leishmaniose felina com uma coleira de matriz polimérica com imidacloprida a 10%/flumetrina a 4,5%

Emanuele Brianti^{1*}, Luigi Falsone^{1†}, Ettore Napoli^{1†}, Gabriella Gaglio¹, Salvatore Giannetto¹, Maria Grazia Pennisi¹, Vito Priolo¹, Maria Stefania Latrofa², Viviana Domenica Tarallo², Fabrizio Solari Basano³, Roberto Nazzari³, Katrin Deuster⁴, Matthias Pollmeier⁴, Laura Gulotta⁵, Vito Colella², Filipe Dantas-Torres^{2,6}, Gioia Capelli⁷ e Domenico Otranto²

Resumo

Base: A leishmaniose causada por *Leishmania infantum* é uma das doenças oriundas de vetores mais importantes que afetam animais e humanos em todo o mundo. Os cães são considerados reservatórios importantes das formas zoonóticas, embora, nos últimos anos, o papel dos gatos como reservatórios venha sendo cada vez mais investigado. A leishmaniose felina (FeL) ocorre em áreas endêmicas e nenhuma medida preventiva específica tem sido investigada até o momento. Neste estudo, avaliou-se a eficácia de uma coleira de matriz polimérica de imidacloprida a 10%/flumetrina a 4,5%, licenciada para prevenção de carrapatos e pulgas, contra a FeL, em um estudo longitudinal em 204 gatos de propriedade particular das ilhas Eólias (Sicília), uma área altamente endêmica quanto à doença. Gatos negativos quanto a FeL receberam coleiras (G1, $n = 104$) ou foram deixados sem tratar (G2, $n = 100$) de março a maio de 2015 [Dia de Estudo 0 [SD 0]]. O diagnóstico consistiu em sorologia e qPCR no sangue e em *swabs* conjuntivais, que foram coletados na linha-base (SD 0) e no final do estudo (SD 360). Foram realizados exames clínicos intervalares em SD 210 (quando os colares foram trocados em G1) e SD 270.

Resultados: Dos 159 gatos que concluíram o estudo, 5 em G1 e 20 em G2 foram positivos quanto a infecção por *L. infantum* em pelo menos um dos testes diagnósticos, levando a uma incidência bruta anual de 6,3 e 25,0% em G1 e G2, respectivamente ($p = 0,0026$). Isso se traduz em uma eficácia de coleira de 75,0% na prevenção de infecção por *Leishmania* felina. A coleira foi geralmente bem tolerada, sem nenhuma reação adversa sistêmica, e poucas reações cutâneas locais foram observadas na área de aplicação em quatro dos 104 gatos tratados (3,8%).

Conclusões: A coleira com imidacloprida a 10%/flumetrina a 4,5% reduziu significativamente o risco de infecção por *L. infantum* em gatos. No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em que se avalia uma estratégia preventiva contra infecção por *Leishmania* felina sob condições naturais. Esses achados preenchem um hiato na medicina veterinária por confirmarem essa coleira como sendo uma ferramenta na redução do risco de infecção por *Leishmania* em gatos. Tal ferramenta preventiva poderia contribuir para a redução do risco da doença em populações animais e humanas quando fosse incluída em programas integrados de controle de leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, Gato, Leishmaniose felina, Prevenção, Piretroides, Flumetrina

* Correspondência: ebrianti@unime.it

† Contribuidores equivalentes

¹ Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina, Messina, Itália

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



© O(s) Autor(es). 2017 **Acesso Aberto** Este é um artigo distribuído sob os termos da Licença de Atribuição *Creative Commons* 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, contanto que você dê o crédito apropriado ao(s) autor(es) original(is) e à fonte, forneça um link para a licença *Creative Commons* e indique se foram feitas alterações. A isenção da Dedicção de Domínio Público da *Creative Commons* (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) se aplica aos dados disponibilizados neste artigo, a menos que seja declarado de outra forma.

Base

A leishmaniose causada por *Leishmania infantum* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*) é uma doença parasitária oriunda de vetores que afeta animais e humanos em todo o mundo. Em humanos, a doença está incluída entre as doenças tropicais negligenciadas mais importantes, com até 0,4 a 1,2 milhão de casos por ano no caso das formas visceral e cutânea, respectivamente [1], e tem sido a única doença tropical oriunda de vetores endêmica do sul da Europa há décadas [2]. Embora os cães sejam considerados como sendo reservatórios primários de *L. infantum* em muitas áreas endêmicas, outras espécies de animais domésticos e silvestres têm sido implicadas na epidemiologia da infecção como reservatórios secundários [3,4]. Desde o primeiro relato de leishmaniose felina (FeL) [5], o gato tem sido considerado como sendo uma espécie resistente, e seu envolvimento tem sido considerado como sendo desprezível para a epidemiologia da infecção [6]. A principal razão para essa suposição foi o baixo número de casos clínicos em gatos, especialmente quando comparados com os de cães que vivem nas mesmas áreas endêmicas [7-12]. Nos últimos anos, o desenvolvimento da medicina veterinária, acoplado ao uso de protocolos sorológicos e moleculares mais refinados para diagnosticar a infecção em gatos, tem fornecido pistas para um melhor entendimento da FeL [13,14]. Portanto, casos de FeL têm sido relatados cada vez mais em áreas endêmicas quanto a leishmaniose canina, com taxas de prevalência de até 68,5%, de acordo com a população estudada e com as metodologias diagnósticas [14]. Da mesma forma, apesar de o número de casos clínicos sempre ter sido considerado como sendo marginal, os relatos de afecções clínicas devidas a FeL estão aumentando em gatos que estão sofrendo de infecções imunodebilitantes concomitantes (tais como vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV)) ou doenças neoplásicas ou em animais sem nenhuma evidência de coinfeções [14]. Notavelmente, os sinais de FeL se sobrepõem parcialmente aos observados em cães doentes, com lesões cutâneas e aumento de volume linfonodal sendo os mais frequentemente descritos [14-16]. Os mosquitos-palha flebotomíneos (flebotomos), os vetores naturais de *L. infantum*, são generalistas em alimentação e podem extrair suas refeições de sangue a partir de vários animais silvestres e domésticos, incluindo gatos [17]. A infecciosidade de gatos infectados por *L. infantum* tem sido demonstrada em estudos de xenodiagnóstico quanto a *Phlebotomus perniciosus* [18] e *Lutzomyia longipalpis* [19], dois vetores competentes. Esses dados forneceram finalmente evidências adicionais sobre o possível papel dos gatos como reservatórios para *L. infantum*. Um estudo recente sobre doenças oriundas de vetores (VBD) de gatos e cães das ilhas Eólias (Sicília, sul da Itália), uma área endêmica quanto a *L. infantum*, com uma prevalência descrita de 26 e 42% em gatos e cães, respectivamente, por meio de métodos sorológicos e moleculares [20]. Além disso, avaliou-se uma incidência anual de até 15% de infecção por *L. infantum* em gatos expostos a uma temporada de transmissão, indicando que, como os cães, gatos que vivem em áreas endêmicas ficam expostos à infecção [20]. Os gatos são reconhecidos agora

como reservatórios domésticos potenciais de *L. infantum* e estratégias para evitar infecção nessa espécie animal têm sido defendidas [14,16].

Atualmente, a estratégia mais promissora para prevenção da infecção por *Leishmania* em cães é o uso de piretroides sintéticos em diferentes formulações (por exemplo, *spot-on*, coleira e *spray*) com propriedades repelentes contra flebotomos [4]. No entanto, a maior parte dos piretroides, exceto quanto à flumetrina, é tóxica para gatos [21], atrapalhando os estudos sobre a prevenção de infecção por *Leishmania* nessa espécie animal [14,16]. Registrou-se recentemente uma coleira de matriz polimérica que contém uma combinação de imidacloprida a 10% e flumetrina a 4,5% (coleira Seresto®, Bayer Animal Health GmbH, Monheim, Alemanha), doravante referida como coleira, para uso em gatos para prevenção de infestações por pulgas e carrapatos associadas com atividade repelente (antialimentação dos insetos) [22]. Essa mesma coleira também está disponível para o controle (por até 8 meses) de carrapatos e pulgas em cães [23]; embora não esteja registrada com uma declaração contra flebotomos, a coleira mostrou ser altamente efetiva (ou seja, eficácia de 88,3 a 100%) em reduzir o risco de infecção por *L. infantum* em cães que vivem em áreas endêmicas [24-26].

No presente estudo, investigamos a eficácia da coleira na prevenção de infecção por *Leishmania* felina em uma coorte de gatos de propriedade particular que vivem no arquipélago das Eólias, onde a FeL por *L. infantum* é altamente endêmica.

Métodos

Locais de estudo e animais

O estudo foi realizado de março de 2015 a abril de 2016 em Lipari e Vulcano, duas das ilhas principais do arquipélago das Eólias (Mar Tirreno, Sicília, Itália, 38,4724° N, 14,9541° E), uma área geográfica reconhecida como sendo endêmica quanto a VBD caninas e felinas e onde se registraram uma prevalência global de 26% e uma incidência de 15% de infecção por *L. infantum* em gatos [20]. Os animais foram inscritos no estudo de março a maio de 2015, antes do início da temporada de flebotomos e não deixaram a área do estudo ou viajaram para outros lugares. Os gatos inscritos no estudo tinham 10 semanas de idade ou mais, em condições satisfatórias de saúde geral, com acesso constante ao ambiente externo ou vivendo externamente a casas e negativos quanto a infecção por *L. infantum* por sorologia, PCR em tempo real quantitativa (qPCR) e citologia (ver abaixo).

Desenho do estudo

O estudo foi um estudo de campo randomizado, parcialmente cegado e negativamente controlado, conduzido com Boas Práticas Clínicas (VICH GL9 GCP) (<http://www.vichsec.org>), realizado em gatos de propriedade particular. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Ministério da Saúde italiano e os animais foram incluídos apenas após a assinatura de um consentimento esclarecido por parte do proprietário. Na inclusão [Dia do Estudo 0 (SD 0)], os gatos foram

identificados, examinados fisicamente, pesados e aloçados para os grupos de tratamento (G1 = coleira Seresto® para gatos ou G2 = controle não tratado) após um plano de alocação aleatória "por residência" para evitar contato entre os gatos que usam coleira e os não tratados. Os animais foram amostrados quanto a sangue e swabs conjuntivais, e os que foram designados para G1 foram tratados com a coleira de acordo com o folheto da embalagem. Resumidamente, a coleira foi apertada ao redor do pescoço do gato e ajustada de acordo com as instruções do rótulo até se obter um ajuste confortável, no qual seria possível inserir dois dedos entre a coleira e o pescoço quando fosse apertada. Os animais designados para o grupo G2 não foram tratados e serviram como controles negativos.

Todos os gatos incluídos foram clinicamente examinados e pesados nos SD 210, 270 e 360 (Fig. 1). Além disso, em SD 360 (conclusão do estudo), os gatos foram amostrados novamente quanto a sangue e swabs conjuntivais. As coleiras dos gatos do grupo G1 foram trocadas em SD 210 e a qualquer momento do estudo em caso de perda ou dano. Durante o estudo, os gatos permaneceram com seus proprietários e foram tratados de acordo com a rotina normal, sem nenhuma medida de contenção ou restrição. Pediu-se que os proprietários observassem seus animais diariamente e relatassem, tão logo notassem, qualquer anormalidade na saúde geral dos animais, bem como perdas ou danos às coleiras nos gatos do grupo G1. Não se permitiu nenhum tratamento com produtos com eficácia conhecida contra vetores de *L. infantum* ou ectoparasitas por todo o estudo. No caso dos animais do grupo G2, em caso de infestação grave por pulgas, permitiu-se um tratamento de resgate com Advantage® para gatos (imidacloprida, Bayer Animal Health GmbH, Monheim, Alemanha) por razões de bem-estar animal.

Coleta de amostras e procedimentos laboratoriais

Amostras sanguíneas de cerca de 5 mL foram coletadas a partir da veia jugular, com 2 mL destas tendo sido divididos em dois tubos com anticoagulante (K₃-EDTA). Preencheram-se dois tubos capilares a partir do primeiro tubo, que foram centrifugados para extração de creme leucocitário e preparação de esfregaços em lâminas de vidro. Processou-se o sangue restante para hemograma completo, utilizando um contador automático de células sanguíneas (ProCyte Dx®, IDEXX

Laboratories, Westbrook, Maine, EUA). O sangue no segundo tubo com EDTA foi processado e analisado para o diagnóstico molecular de *L. infantum*. Três mililitros de sangue foram armazenados em um tubo com ativador de coagulação, a partir do qual se obteve o soro por meio de centrifugação (1.800x g por 10 min), e foram armazenados congelados (-20°C) até a análise. Swabs conjuntivais foram coletados para o diagnóstico de infecção por *L. infantum*, utilizando-se swabs de algodão estéreis fabricados para isolamento bacteriológico. Coletou-se uma amostra por olho por meio de esfregamento do swab contra a superfície da pálpebra inferior para coletar as células esfoliantes. Os swabs conjuntivais foram mantidos em tubos estéreis e armazenados congelados (-20°C) até a análise. As amostras séricas coletadas em SD 0 e SD 360 foram testadas quanto a anticorpos anti-*L. infantum* por meio do uso de um protocolo de teste de anticorpos imunofluorescentes (IFAT), conforme descrito em outro local [27]. O teste IFAT foi preparado usando-se conjugados específicos para gatos (anti-IgG felino; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), e incluiu-se um controle positivo, obtido a partir do soro de um gato doente com *L. infantum*, em cada lâmina. As amostras foram classificadas como positivas quando produziam uma fluorescência citoplasmática e de membrana evidente dos protomastigotos em uma diluição de corte de 1:80 no caso de gatos em SD 360 (conclusão do estudo), embora animais com diluição de 1:40 de soro coletado em SD 0 (inclusão) tenham sido excluídos do estudo. Os soros positivos foram titulados por diluições seriadas até serem obtidos resultados negativos. As amostras sanguíneas e os swabs conjuntivais coletados em SD 0 e SD 360 foram analisados molecularmente quanto a *L. infantum* por meio de qPCR. Resumidamente, extraiu-se o DNA genômico a partir do sangue e dos swabs conjuntivais utilizando o *QIAamp DNA Micro Kit* (Qiagen, Milão, Itália), seguindo as recomendações do fabricante. Depois disso, amplificou-se um fragmento (12 bp) do DNA de cinetoplasto (kDNA) de minicírculo de *L. infantum* por meio de qPCR, utilizando um protocolo descrito em outro local [28]. Foram incluídos controles positivos (DNA de amostras sanguíneas patógeno-positivas) e negativos (sem DNA) no caso de todos os testes de PCR.

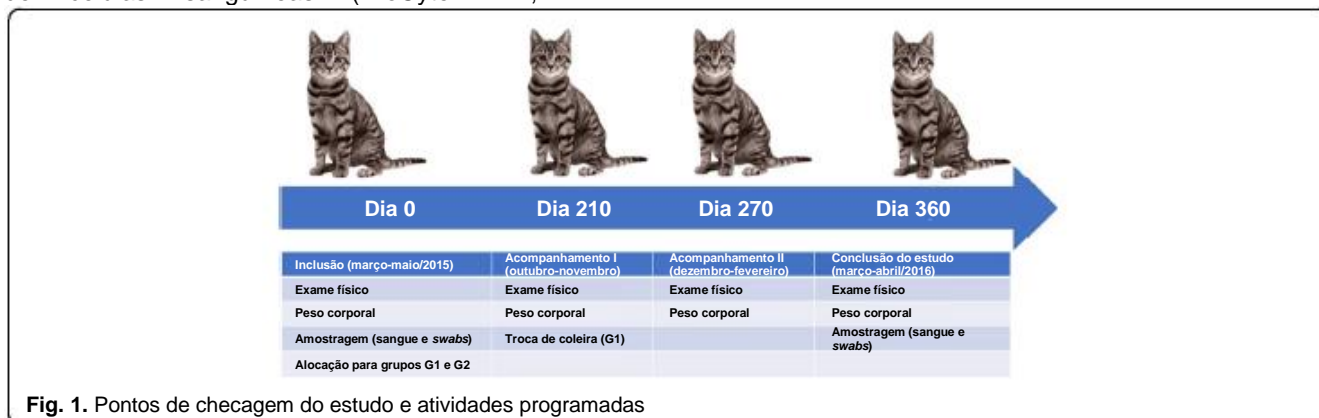


Fig. 1. Pontos de checagem do estudo e atividades programadas

Esfregaços de creme leucocitário foram preparados conforme descrito acima e corados usando-se o corante rápido de May-Grünwald-Giemsa (Bio Optica, Milão, Itália). Inclusões intracelulares ou formas livres de amastigoto de *L. infantum* foram procuradas em cada esfregaço por meio de um exame da área corada inteira em pequeno aumento (x100) e de áreas representativas e grande aumento (x1.000) por 10 min. Todos os esfregaços e amostras foram identificados usando-se um código alfanumérico único, e o pessoal do laboratório que realizou as análises estava cego quanto aos grupos de tratamento.

Pesquisa entomológica

Armadilhas luminosas e pegajosas foram usadas para monitorar a presença e a atividade de flebótomos durante o período do estudo. As armadilhas foram colocadas mensalmente em oito locais diferentes (cinco em Lipari e três em Vulcano) de maio a dezembro de 2015. As armadilhas foram colocadas próximo das residências em que gatos foram incluídos no estudo (Fig. 2). Em cada local e para cada sessão de captura, uma armadilha luminosa e armadilhas pegajosas para um total de 2 m² foram preparadas e deixadas operando por 2 dias consecutivos (armadilhas pegajosas) ou 2 noites consecutivas, ou seja, das 6:00 da tarde às 7:00 da manhã (armadilhas luminosas). A atividade de captura foi concluída em cada local após duas sessões de captura negativas consecutivas. Os flebótomos coletados foram separados a partir de outros insetos com o auxílio de um estereomicroscópio, foram diferenciados por sexo e foram armazenados em frascos que continham etanol a 70%, de acordo com o local e a data de captura. As amostras de flebótomos foram preparadas para observação microscópica conforme descrito em outro local [29] e foram identificadas no nível de espécie utilizando chaves morfológicas [30].



Fig. 2. Captura de flebótomos nas dependências de uma residência na ilha de Lipari. Uma armadilha luminosa (seta LT) e armadilhas pegajosas (seta ST) foram montadas mensalmente e deixadas funcionando por dois dias consecutivos em cada um de oito locais.

Gerenciamento de dados e análises estatísticas

Estimou-se um tamanho de amostra mínimo de 80 gatos por cada grupo com base nas seguintes suposições: nível de confiança: 95%; potência: 80%; e incidência esperada de infecção por *L. infantum* de 2 e 12% em gatos tratados e não tratados, respectivamente. Para se preparar para uma desistência de cerca de 20%

durante o período de estudo, incluiu-se um mínimo de 100 gatos em cada grupo. Um gato foi considerado como infectado por *L. infantum* se testasse positivamente em pelo menos um dos testes diagnósticos empregados (IFAT, qPCR no sangue ou em swabs conjuntivais ou citologia de creme leucocitário). A eficácia na prevenção de infecção por *L. infantum* foi baseada na incidência bruta anual (YCI) e na porcentagem de gatos infectados em cada grupo em SD 360 e foi calculada em cada grupo como segue: YCI = número de animais infectados/(número de animais negativos incluídos - número de animais que não concluíram o estudo) x 100.

A diferença de YCI em G1 e G2 foi testada quanto a significância estatística usando-se o teste do qui-quadrado. A eficácia na prevenção de infecção por *Leishmania* foi calculada usando-se a seguinte fórmula: Eficácia = [(A - B)/A] x 100, em que A é a % de animais infectados no grupo controle e B é a % de animais no grupo tratado.

As análises estatísticas e a randomização foram realizadas usando-se os pacotes estatísticos SPSS® 13.0, nQuery + nTerim 3.0 (StatSols), Statistical Solutions® Ltd. 2014 e Microsoft® Excel 2010.

Resultados

Inscreeveu-se um total de 204 gatos (104 em G1 e 100 em G2), pertencentes a 80 proprietários, no estudo em SD 0. A população em estudo foi composta por 111 fêmeas (54,4%) e 93 machos (45,6%), com idade variando de 6 meses a 15 anos. Durante o estudo, 45 gatos (25 de G1 e 20 de G2) foram removidos ou perdidos no acompanhamento por diferentes razões (por exemplo, animal perdido, coleira perdida e não repostada dentro de dois dias, eventos adversos ou suspeita de reação medicamentosa adversa), enquanto 159 animais (79 de G1 e 80 de G2) concluíram o estudo (Tabela 1). Entre os gatos excluídos, 18 (8 de G1 e 10 de G2) foram retirados após a inscrição por se ter descoberto que estavam infectados por *L. infantum* em amostras coletadas em SD 0. Nas amostras coletadas na conclusão do estudo (SD 360), 5 de 79 gatos em G1 e 20 de 80 gatos em G2 foram classificados como positivos quanto a infecção por *L. infantum* em pelo menos um dos testes diagnósticos (Tabela 2). A maioria dos animais testaram positivamente por meio de IFAT (15/25; 60%), enquanto alguns gatos ficaram positivos por meio de qPCR no sangue (5/25; 20%), em swab conjuntival (1/25; 4%) ou em ambas as amostras (4/25; 16%). Apenas três gatos (3/25; 12%) testaram positivamente por IFAT e qPCR no sangue e/ou em swab conjuntival simultaneamente. Nenhum dos gatos testou positivamente na citologia em esfregaços de creme leucocitário na inclusão (SD 0) ou na conclusão do estudo (SD 360). A YCI foi de 6,3% em G1 e 25,0% em G2 ($\chi^2 = 9,095$, $df = 1$, $p = 0,0026$), levando a uma eficácia de 75% da coleira na prevenção de infecção por FeL. Na conclusão do estudo, todos os gatos estavam em boa saúde geral; no entanto, alguns deles exibiam sinais sistêmicos, tais como aumento de volume linfonodal periférico (G1 = 15,2%; G2 = 35,0%) e esplenomegalia (G1 = 5,1%; G2 = 21,3%). Os sinais clínicos foram mais frequentes nos animais do grupo G2 do que nos do G1 ($\chi^2 = 7,266$, $df = 1$, $p = 0,0070$).

Tabela 1. Número e características dos gatos tratados com a coleira Seresto® (G1) e dos controles não tratados (G2) que concluíram o estudo ou foram excluídos deste

	G1	G2	Total
Concluíram o estudo			
Número de gatos	79	80	159
Número de residências	41	39	80
Média de idade (meses) (Mínimo-Máximo)	38,3 (6-180)	29,3 (7-144)	33,7 (6-180)
Sexo (%)			
Feminino/Masculino	53,2/46,8	55,0/45,0	54,1/45,9
Peso (kg) Médio (Mínimo-Máximo)	4,3 (1,9-7,8)	3,9 (2,1-7,0)	4,09 (1,9-7,8)
Comprimento de pelo (%) Curto/Longo	81,0/19,0	78,8/21,2	79,9/20,1
Ambiente (%) Rural/Suburbano/Urano	48,1/48,1/3,8	56,2/38,8/5,0	52,2/43,4/4,4
Excluídos do estudo	G1	G2	Total
Número de gatos	25	20	45
Mortos ²	6	3	9
Suspeita de reação medicamentosa adversa	1	-	1
Infectados por <i>L. infantum</i> na inclusão	8	10	18
Perdidos no acompanhamento	8	7	15
Coleira perdida e não reposta imediatamente	2	-	2

^a Traumatismo por automóvel ($n = 4$), suspeita de doença infecciosa ($n = 3$), insuficiência respiratória ($n = 1$), tromboembolia aórtica ($n = 1$)

Tabela 2. Resultados de sorologia (IFAT) e qPCR no sangue e em swabs conjuntivais quanto a *Leishmania infantum* em gatos tratados com a coleira Seresto® (G1) ou em controles não tratados (G2) após serem expostos a uma temporada de transmissão em uma área altamente endêmica

Grupo	n	Título de IFAT		qPCR		Total (%) ^a
		1:80	1:160	Sangue	CS	
G1	79	2	1	2	1	5 (6,3) ^A
G2	80	9	3	10	5	20 (25,0) ^B

^a Não a soma por grupo e sequência como animais individuais que testaram positivamente em múltiplos testes, mas o número total de indivíduos que testaram positivamente em um grupo

As diferenças significativas são marcadas com letras maiúsculas diferentes ($\chi^2 = 9,095$, $df = 1$, $p = 0,0026$)

Abreviação: CS, swab conjuntival

Durante o estudo, 18 gatos perderam a coleira uma vez e um perdeu duas vezes; as coleiras foram repostas dentro de 2 dias, exceto em dois casos, em que a perda não foi relatada pelo proprietário, resultando na exclusão de animais a partir do estudo (Tabela 1). A coleira foi bem tolerada e poucas reações cutâneas locais foram observadas na área de aplicação em quatro dos 104 gatos tratados (3,8%). Desses, um exibiu alopecia leve, dois exibiram dermatite e prurido leves e um apresentou dermatite ulcerativa. Exceto quanto ao último caso, em que a coleira foi removida e o animal foi excluído do estudo e tratado topicamente (ou seja, drogas antibióticas e anti-inflamatórias), todos os outros casos se recuperaram em poucos dias sem a necessidade de remover a coleira. Foram registradas infestações pesadas por pulgas e a dermatite com coceira associada em 16 gatos do grupo G2; no caso desses animais, foram autorizados tratamentos de resgate com um produto *spot-on* comercial que continha imidacloprida (Advantage® para gatos, Bayer Animal Health GmbH, Monheim, Alemanha) com base no bem-estar.

Globalmente, foram capturados 329 flebótomos pertencentes a três espécies (nominalmente *P. perniciosus* ($n = 296$; 90,0%), *Phlebotomus neglectus* ($n = 16$; 4,8%) e *Sergentomyia minuta* ($n = 17$; 5,2%)) do final de maio até outubro de 2015. A maioria dos flebótomos foi capturada por meio de armadilhas luminosas ($n = 297$; 90,3%) (Tabela 3).

Discussão

A coleira Seresto® que contém uma combinação de imidacloprida a 10% e flumetrina a 4,5% mostrou ser efetiva na redução do risco de infecção por *L. infantum* em gatos, tornando-se assim uma ferramenta para controlar FeL em áreas endêmicas. A YCI registrada aqui em G2 (ou seja, 25%) foi mais alta que a registrada anteriormente em gatos (15%) nas mesmas áreas [20], mas semelhante à dos cães (ou seja, 27%). Os gatos incluídos neste estudo ficaram em alto risco de infecção por *L. infantum* com o estudo sendo realizado em uma área altamente endêmica quanto a FeL. A vasta maioria dos gatos vivia constantemente no ambiente externo à casa em áreas suburbanas ou rurais; além disso, os animais do grupo controle não foram tratados com nenhum inseticida, exceto nos casos de tratamentos de resgate contra infecção pesada por pulgas. Embora os gatos pareçam ser mais resistentes a *L. infantum* que os cães [6], os presentes dados sugerem que pelo menos a probabilidade de infecção nesses dois hospedeiros é semelhante, pois se baseia no risco de ficarem expostos a picadas de flebótomos, também considerando que alguns vetores exibem um comportamento alimentar genérico [17].

O diagnóstico de infecção por *Leishmania* em gatos é desafiador [14]. A maioria dos gatos infectados foi classificada positivamente por meio de IFAT, mas deve-se observar que 10 dos 25 animais infectados testaram positivamente apenas por meio de qPCR, com o tecido sanguíneo sendo mais frequentemente positivo (9/10) do que o swab conjuntival (5/10) ($\chi^2 = 2,143$, $df = 1$, $p = 0,1432$). Embora uma comparação de resultados entre diferentes estudos nem sempre seja possível, nossos achados concordam globalmente com os descritos em pesquisas anteriores, que combinaram testes sorológicos e moleculares para investigar a prevalência de infecção felina por *L. infantum* [20,31,32]. Por outro lado, os swabs conjuntivais foram considerados recentemente como sendo uma técnica não invasiva sensível para o diagnóstico molecular de infecção por *L. infantum* tanto em cães quanto em gatos [33-35], exibindo valores preditivos em animais com infecção ativa ou doentes e uma concordância substancial entre os testes sorológicos e moleculares [34]. No presente estudo, o propósito do diagnóstico era descobrir uma exposição a picadas de flebótomos infectantes ou infecções ativas em que já tenha ocorrido soroconversão. Portanto, vários resultados sorológicos e moleculares observados refletem os diferentes estágios da infecção em que os animais expostos podem se encontrar. De acordo com essa variedade de padrões, é fortemente aconselhável combinar testes diagnósticos sorológicos e moleculares quando o propósito do diagnóstico é verificar a exposição à infecção por *L. infantum*.

Tabela 3. Locais e meses de captura de *Phlebotomus perniciosus* na área de estudo. Foram usadas uma armadilha luminosa e armadilhas pegajosas para um total de 2 m² em cada local

Local	Ambiente	Mês de captura					
Lipari 1	Urbano		Junho	Julho			
Lipari 2	Rural	Maio		Julho	Agosto	Setembro	Outubro
Lipari 3	Suburbano			Julho	Agosto	Setembro	
Lipari 4	Urbano		Junho				
Lipari 5	Urbano					Setembro	
Vulcano 1	Rural	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
Vulcano 2	Rural	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
Vulcano 3	Suburbano				Agosto	Setembro	

Em muitos casos, os gatos infectados por *L. infantum* permanecem aparentemente saudáveis, e a progressão para doença clínica pode estar associada com afecções imunossupressivas causadas por doenças concomitantes. Também se tem teorizado uma predisposição natural para um padrão de resposta imune mediado por células protetoras para a infecção por *Leishmania* no caso de gatos [16]. Infecções retrovirais ou outras doenças debilitantes (por exemplo, doenças neoplásicas) têm sido associadas algumas vezes com Fel clínica ou infecção subclínica por *L. infantum* [14], mas não em um estudo anterior no arquipélago das Eólias, onde essas infecções são raras nas populações felinas examinadas [20]. Também se deve observar que a média de idade dos animais inscritos era de menos de três anos e que os que testaram positivamente na conclusão do estudo foram infectados muito provavelmente pela primeira vez. Esses achados podem responder pela ausência de casos clínicos de FeL em gatos positivos nesse estudo, embora a leishmaniose evolua geralmente como doença crônica, com um longo período de incubação [16].

A coleira provou ser segura e, com exceção de algumas reações locais no ponto de aplicação da coleira, nenhum evento adverso foi avaliado como sendo relacionado ao produto. As reações locais foram principalmente irritações dérmicas causadas provavelmente pelo esfregamento mecânico da coleira sobre o pelame e a pele dos gatos e foram semelhantes (quanto a frequência e tipologia) às observadas em estudos anteriores [22,23]. Todas as reações cutâneas ocorreram nas primeiras semanas (1-4) após a aplicação da coleira e se curaram espontaneamente após um leve afrouxamento da coleira, com exceção de um caso, no qual se removeu a coleira para permitir um melhor tratamento tópico da lesão. A formulação de liberação lenta torna a coleira um dispositivo ideal para a espécie felina sensível a drogas e permite o uso da flumetrina, um acaricida potente com propriedades repelentes de ação rápida, devido às diferenças na via metabólica em uma espécie em que não é possível aplicar nenhum dos outros piretroides atuais [21]. Adicionalmente, outra característica segura da coleira é o seu sistema de liberação seguro, que a torna particularmente segura em gatos errantes. De fato, embora todos os gatos com coleira inscritos no estudo tivessem acesso ao ambiente externo das residências, não se observou nenhum caso de enganchamento ou estrangulamento causado pela coleira.

A pesquisa entomológica confirmou a presença de vetores competentes de *L. infantum* em todos locais monitorados, nominalmente *P. perniciosus* e *P. neglectus*, ambos considerados como sendo os vetores mais importantes de *L. infantum* na bacia do Mediterrâneo. Esse achado está de acordo com pesquisas anteriores realizadas recentemente na mesma latitude [29]. Poucos estudos investigaram a fauna de flebotomos nas ilhas Eólias e, na única pesquisa realizada no mesmo arquipélago (ilhas Lipari e Filicudi) utilizando armadilhas pegajosas, *P. perniciosus* foi a única espécie capturada [36]. Portanto, o presente estudo complementa o número de espécies de flebotomos descritas no arquipélago com outras duas espécies, com uma destas (*P. neglectus*) sendo um vetor comprovado de *L. infantum*. De modo interessante, *P. perniciosus* foi encontrado em locais caracterizados por ambientes diferentes (ou seja, urbanos, periurbanos e rurais) durante a pesquisa. No entanto, a presença e a atividade mais longas de *P. perniciosus* foram registradas em locais rurais em ambas as ilhas Lipari e Vulcano, com atividade constante do final de maio até outubro e picos em julho e agosto. Esse pode representar o período de risco mais alto de exposição à infecção por *L. infantum*, especialmente no meio do verão, quando turistas e seus animais chegam em grande número para passar férias nessas ilhas.

Conclusões

Este estudo mostra que a coleira Seresto[®], que contém uma combinação de imidacloprida e flumetrina é segura e efetiva na redução do risco de infecção felina por *L. infantum*. Essa coleira representa atualmente a única medida preventiva possível para FeL. O tratamento deve ser adotado estrategicamente para proporcionar proteção individual para gatos que vivem em áreas endêmicas de *L. infantum* ou viajam para estas ou para reduzir o potencial de os gatos infectados atuarem como reservatórios do patógeno.

Abreviações

DNA: ácido desoxirribonucleico; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; FeL: leishmaniose felina; FeLV: vírus da leucemia felina; FIV: vírus da imunodeficiência felina; IFAT: teste de anticorpos imunofluorescentes; qPCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativa; SD: dia do estudo; VBD: doenças oriundas de vetores; YCI: incidência bruta anual.

Agradecimentos

Não aplicável.

Financiamento

Este estudo foi financiado pela Bayer Animal Health. A Bayer exerceu um papel direto no desenho do estudo, na coleta e na análise de dados, na decisão de publicar e na preparação do manuscrito.

Disponibilidade de dados e materiais

Os dados que apoiam os achados deste estudo estão disponíveis a partir da Bayer Animal Health, mas aplicam-se restrições à disponibilidade desses dados, que foram usados sob licença para o atual estudo e, assim, não estão publicamente disponíveis. No entanto, estão disponíveis dados a partir dos autores mediante uma requisição razoável e com permissão da Bayer Animal Health.

Contribuições dos autores

Conceberam, desenharam e supervisionaram o estudo: EB, DO, FDT, FSB, MP e KD.

Realizaram os experimentos: EB, LF, EN, GG, LG, MGP, VP, MSL, VDT e VC.

Analisaram os dados: FSB, EB, DO, MP e GC. Contribuíram com reagentes/materiais/ferramentas de análise: EB, SG, MGP, DO, FSB, RN, KD, MP e GC. Redigiram o artigo: EB e DO, com contribuição dos coautores. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Aprovação ética

O protocolo de estudo e os procedimentos de investigação foram aprovados pelo Ministério da Saúde italiano (autorização nº 0006088-10/03/2015-DGSAF-COD_UO-P). Os animais só foram incluídos no estudo após a assinatura de um consentimento esclarecido pelo proprietário.

Consentimento para publicação

Não aplicável.

Interesses conflitantes

KD e MP são funcionários da Bayer Animal Health, que financiou o estudo. FSB e RN são funcionários da Arcoblu s.r.l., que atuou como CRO e monitorou o estudo.

Nota do publicador

A Springer Nature se mantém neutra com relação às reivindicações jurídicas referentes a mapas publicados e afiliações institucionais.

Detalhes dos autores

¹ Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina, Messina, Itália. ² Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, Bari, Itália. ³ Arcoblu s.r.l., Milão, Itália. ⁴ Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Alemanha. ⁵ Clínico veterinário, Ambulatório Veterinário S. Lucia, Via F. Crispi 56, Lipari, Itália. ⁶ Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Recife, Brasil. ⁷ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Parassitologia, Legnano, Itália.

Recebido: 26 de abril de 2017 Aceito: 20 de junho de 2017

Publicado online: 14 de julho de 2017

Referências

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7:e35671.
- Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadiou K, *et al.* Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis. *Europe Emerg Infect Dis*. 2008;14:1013-8.
- Gramiccia M. Recent advances in leishmaniasis in pet animals: epidemiology diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*. 2011;181:23-30.
- Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol*. 2013;29:339-45.
- Sergent ED, Sergent ET, Lombard J, Quilichini M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bull Soc Pathol Exot*. 1912;2:93-8.
- Kirkpatrick CE, Farrell JP, Goldschmidt MH. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Exp Parasitol*. 1984;58:125-31.
- Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet Parasitol*. 2010;174:37-42.
- Mancianti F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia*. 2004;46:203-6.
- Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol*. 2007;145:267-73.
- Nasereddin A, Salant H, Abdeen Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Vet Parasitol*. 2008;158:364-9.
- Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, *et al.* Feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol*. 2002;106:181-91.
- Sarkari B, Hatam GR, Adnani SJ, Asgari O. Seroprevalence of feline leishmaniasis in areas of Iran where *Leishmania infantum* is endemic. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009;103:275-7.
- Maia C, Campino L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol*. 2011;27:341-4.
- Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Mirò G, *et al.* LeishVet update and recommendations on feline leishmaniasis. *Parasite Vectors*. 2015;8:302.
- Navarro JA, Sánchez J, Peñafiel-Verdú C, Buendía AJ, Altimira J, Vilafranca M. Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniasis. *J Comp Pathol*. 2010;143:297-302.
- Soares CS, Duarte SC, Sousa SR. What do we know about feline leishmaniasis? *J Feline Med Surg*. 2016;18:435-42.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013;27:123-47.
- Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sand flies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 2007;145:357-60.
- da Silva SM, Rabelo PF, Gontijo Nde F, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, *et al.* First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet Parasitol*. 2010;174:150-4.
- Otranto D, Napoli E, Latrofa MS, Annoscia G, Tarallo VD, Greco G, *et al.* Feline and canine leishmaniasis and other vector-borne diseases in Aeolian islands: pathogen and vector circulation in a confined environment. *Vet Parasitol*. 2017;236:144-51.
- Linnett PJ. Permethrin toxicosis in cats. *Aust Vet J*. 2008;86:32-5.
- Stanneck D, Rass J, Radeloff I, Kruehdewagen E, Le Sueur C, Hellmann K, *et al.* 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.
- Stanneck D, Kruehdewagen EM, Fourie JJ, Horak IG, Davis W, Krieger KJ. Efficacy of an imidacloprid/flumethrin collar against fleas and ticks on cats. *Parasit Vectors*. 2012;5:82.
- Otranto D, Dantas-Torres F, de Caprariis D, Di Paola G, Tarallo VD, Latrofa MS, *et al.* Prevention of canine leishmaniasis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin. *PLoS One*. 2013;8:e56374.
- Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Solari Basano F, *et al.* Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%/flumethrin (4.5%)) collar for the prevention of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2014;7:327.
- Brianti E, Napoli E, Gaglio G, Falsone L, Giannetto S, Solari Basano F, *et al.* Field evaluation of two different treatment approaches and their ability to control fleas and prevent canine leishmaniasis in a highly endemic area. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004987.
- Otranto D, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa MS, Diniz PP, de Caprariis D, *et al.* Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3316-24.
- Dantas-Torres F, Latrofa MS, Otranto D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors*. 2011;4:56.
- Gaglio G, Brianti E, Napoli E, Falsone L, Dantas-Torres F, Tarallo VD, *et al.* 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;133:73-7.
- Dantas-Torres F, Tarallo VD, Otranto D. Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (*Diptera: Phlebotominae*). *Parasit Vectors*. 2014;7:479.
- Chatzis MK, Andreadou M, Leontides L, Kasabalas D, Mylonakis M, Koutinas AF, *et al.* Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. *Vet Parasitol*. 2014;202:217-25.

32. Chatzis MK, Leontides L, Athanasiou LV, Papadopoulos E, Kasabalis D, Mylonakis M, et al. Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Exp Parasitol*. 2014;147:54-9.
33. Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet Parasitol*. 2012;184:10-7.
34. Di Muccio T, Veronesi F, Antognoni MT, Onofri A, Piergili Fioretti D, Gramiccia M. Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2651-9.
35. Oliveira GC, Paiz LM, Menozzi BD, Lima Mde S, de Moraes CC, Langoni H. Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2015;24:464-70.
36. Maroli M, Lavagnino A, Ansaldi G, Cavallini C. Leishmaniasis vectors (*Diptera, Psychodidae*) in 3 different environments of western Sicily and 2 of the Aeolians Islands. *Parassitologia*. 1990;32:305-11.

Envie seu próximo manuscrito para a BioMed Central e nós o ajudaremos em cada etapa:

- Aceitamos consultas pré-submissão
- Nossa ferramenta seletora o ajuda a encontrar a publicação mais relevante
- Oferecemos suporte ao cliente dia e noite
- Submissão *online* conveniente
- Revisão por pares completa
- Inclusão no PubMed e em todos os principais serviços de indexação
- Visibilidade máxima para a sua pesquisa

Submeta seu manuscrito em
www.biomedcentral.com/submit

