



RELATÓRIO DE ESTUDO

“Avaliação da eficácia da coleira LEEVRE, no controle do flebotomíneo
Lutzomyia longipalpis, em condições experimentais, em cães.”

SUMÁRIO

1.Introdução.....	3
2.Objetivo.....	8
3.Justificativa.....	8
4.Documentos de Referência	8
5.Material e Métodos	8
5.1 Local e período de realização	8
5.2 Animais utilizados no estudo e identificação	9
5.3 Ambiente e Manejo	9
5.4 Origem e destino dos animais estudados	10
5.5 Critérios de inclusão e exclusão dos animais	11
5.6 Recrutamento, seleção e alocação dos animais	11
5.7 Seleção dos flebotomíneos da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i>	12
5.8 Tratamento Experimental	13
5.9 Delineamento do estudo	14
5.10 Procedimentos experimentais	15
6.Cronograma do estudo	20
7.Resultados e Discussão	21
8.Eventos Adversos	28
9.Conclusão	28
10.Referências	29

1. INTRODUÇÃO

As leishmanias são protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae* do gênero *Leishmania*, um parasita intracelular obrigatório que ataca as células do sistema imunológico de mamíferos (PUENTES et al., 2000 apud SILVA, 2011). Possui a forma flagelada e promastigota encontrada no tubo digestivo dos insetos vetores e a forma aflagelada e amastigota que parasita o tecido dos vertebrados (BRASIL, 2006) conforme a figura 1.



Figura 1. Forma flagelada e promastigota e forma aflagelada e amastigota da *Leishmania* (BRASIL, 2006).

De acordo com a espécie de leishmania, a doença pode ser cutânea ou visceral. As principais espécies dermatrópicas no Brasil são: *Leishmania (Leishmania) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni* e *Leishmania (Viannia) lindenberg* (BRASIL, 2007). E o principal agente da forma visceral é a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (BRASIL, 2006).

Podemos verificar na tabela 1, as principais espécies de *Leishmania* encontradas no mundo e sua relação com o tipo de leishmaniose.

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* no Novo e Velho Mundo (adaptado de Greene, 2006 apud Monteiro, 2010).

Leishmaniose	Velho Mundo	Novo Mundo
Visceral	<i>L. donovani</i>	<i>L. chagasi</i>
	<i>L. infantum</i>	(<i>L. infantum</i>)
Cutânea	<i>L. aesthiopica</i>	<i>L. mexicana</i>
	<i>L. major</i>	<i>L. amazonensis</i>
	<i>L. infantum</i>	<i>L. venezuelensis</i>
	<i>L. tropica</i>	<i>L. (Viçmia) brasiliensis</i>
		<i>L. panamensis</i>
		<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. lainsoni</i>
	<i>L. naiffi</i>	
	<i>L. zhari</i>	
Mucocutâneas		<i>L. brasiliensis</i>
		<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. panamensis</i>

A Leishmaniose Tegumentar (LT) ou cutânea acomete a pele e mucosas, constituindo um grande problema de saúde pública, especialmente na região Norte do Brasil, pelo risco de ocorrência de deformidades no ser humano, com reflexos sociais e econômicos (BRASIL, 2007). É uma antroponose, ou seja, é uma doença primária nos animais e que pode ser transmitida ao homem. A participação humana no ciclo do parasito é apenas acidental ou secundária.

Os reservatórios animais da LT são principalmente os animais silvestres, tais como roedores, marsupiais e canídeos. Os animais domésticos (canídeos, felídeos e equídeos) podem ser considerados hospedeiros acidentais da doença, não havendo comprovação da sua participação como reservatórios. Nestes, a doença pode ocorrer de forma crônica, como no ser humano, acometendo principalmente as mucosas de vias aéreas superiores (BRASIL, 2007).

Sua transmissão ao ser humano ocorre através de vetores insetos da subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*. As principais espécies que participam deste ciclo no Brasil, de acordo com o protozoário infectado, são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (BRASIL, 2007).

A Leishmaniose Visceral (LV) também é uma antroponose. Tem grande importância epidemiológica pelo seu aumento na incidência mundial e sua alta letalidade. Também é denominada Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou calazar neo-tropical (BRASIL, 2006).

Possui ampla distribuição geográfica e ocorrência em 88 países (ASHFORD, 2000; ALVES E FAUSTINO, 2005), sendo que 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão e Brasil (ALVES E BEVILACQUA, 2004).

No Brasil, a LV está registrada em 19 estados, com mais de 1600 municípios que apresentam a doença de origem, com exceção da região Sul (BRASIL, 2006). Entre as diversas áreas da Federação Brasileira, a região Nordeste, detém a maior parte dos casos (ASHFORD, 1998) especialmente os estados do Ceará e Piauí (SILVA, 2011).

No Brasil, a doença que era eminentemente rural, atualmente passa por um processo de urbanização (GONTIJO E MELO, 2004). Neste contexto, vários perfis epidemiológicos da doença tem sido descritos na dependência do vetor, reservatório e distribuição espacial da enfermidade (POCAI et al, 1998). Em revisão feita por Silva (2011), justifica-se a expansão da LV devido às mudanças sociais e ambientais ocasionadas pelo processo de urbanização dos municípios. O desequilíbrio ambiental ocasionado acarreta o desalojamento de reservatórios e vetores, favorecendo domiciliação e aumentando o risco de transmissão da doença. A carência de saneamento básico e o acúmulo de lixo pela grande densidade populacional são favoráveis à sobrevivência e adaptação de vetores.

A doença tem como agente causal no Brasil um protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (*L. chagasi*). Esta pode ser considerada uma subespécie da *Leishmania infantum*. A *L. infantum* e *L. donovani* foram descritas mais antigamente e encontradas na Ásia, África, Europa e Oriente Médio. A *L. chagasi* foi mais recentemente descoberta nas Américas.

Há diversos relatos distintos sobre o assunto e muita discussão desde a descoberta da *L. chagasi* por Cunha e Chagas em 1937. A *L. infantum* e a *L. chagasi* não são distinguíveis como espécie; alguns autores relatam uma mínima diferença fenotípica e genotípica, segundo opinião de Dantas-Torres (2006). Desta forma, a literatura é bem diversa e observamos relatos de nomenclatura como *L. infantum chagasi* ou *L. chagasi*.

No ambiente silvestre, os reservatórios do parasita são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). Por outro lado, os cães domésticos são considerados os principais reservatórios da *Leishmania* no ambiente domiciliar, sendo de grande importância na manutenção do ciclo da doença (MILES et al. 1999; NOLI, 1999; VIANNA, 2001; BRITO et al. 2006). Sua importância está relacionada à frequência e abundância do parasitismo, bem como, a alta prevalência da doença na população canina (SLAPPENDEL, 1988; REITHINGER et al., 2002; CIARAMELA E CORONA, 2003; ENGERDA et al., 2004; ALBUQUERQUE et al., 2007).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença sistêmica severa e em alguns casos fatal, sendo considerada como doença imunomediada, causando uma grande variedade de sinais clínicos. Após a infecção, muitos cães apresentam doença crônica progressiva com exibição de inúmeros sinais clínicos, como dermatopatias, linfadenopatia, caquexia. Porém, pode ser extremamente frequente não apresentarem nenhum sinal clínico, considerado por pesquisadores, o período de infecção silenciosa (BRASIL, 2006).

A doença é transmitida através de vetores que fazem o repasto sanguíneo nos reservatórios do parasita e o carregam acidentalmente ao ser humano.

Existem mais de 30 vetores pelo mundo, no entanto os principais são insetos hematófagos da subfamília *Phlebotominae*, gênero *Phlebotomus*, encontrados no Velho Mundo e gênero *Lutzomyia*, encontrados no Novo Mundo como no Brasil. Existem em torno de 470 espécies e subespécies deste gênero *Lutzomyia*, sendo 299 encontrados no Brasil e apenas 3 delas (*L. longipalpis*, *L. cruzi*, *L. migonei*) potencialmente relacionadas à transmissão da LV, segundo revisão de Silva (2011).

Com o processo de urbanização da leishmaniose visceral, ocorreu um processo de adaptação de vetor às áreas urbanas e habitats diversificados. Algumas espécies de flebotomíneos, que até então apresentavam comportamento silvestre, tem sido encontradas perto de habitações humanas, em plantações de bananeiras e também em áreas florestais, demonstrando que se encontra em processo de adaptação às modificações provocadas pelo homem (MISSAWA E LIMA, 2006; LAINSON E RANGEL, 2005).

O principal vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, o qual se encontra amplamente distribuído nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil (MISSAWA E LIMA, 2006; BRASIL, 2006), onde é popularmente chamado de mosquito palha, birigui, asa dura ou cangalhinha. Alimenta-se de uma grande variedade de espécies, incluindo animais silvestres e domésticos além do homem (BARATA et al., 2005). As demais espécies *L. cruzi* e *L. migonei* tiveram poucos relatos e parecem estar restritas no centro-oeste e nordeste do Brasil, respectivamente (SANTOS et al, 1998; BRASIL, 2006; CARVALHO et al., 2010; SILVA, 2011).

A *Lutzomyia migonei* é o vetor principal da Leishmaniose Tegumentar (LT) na região Sudeste e considerado um vetor secundário na região Nordeste. Tem grande capacidade de se adaptar a novas condições ambientais, com alto grau de antropofilia. Recentemente foi relatada como vetor da *Leishmania infantum chagasi* (LV) no Brasil (CAARVALHO et al, 2010). Em estudo de Silva (2011), realizado em Fortaleza (CE), uma área endêmica de LV, observou-se a prevalência de 56% de *L. longipalpis* e 44% de *L. migonei*. Ambas as espécies estão adaptadas ao ambiente domiciliar e externo. Com isso, sugere-se que a *L. migonei* pode contribuir na disseminação da doença na população humana em algumas regiões do Nordeste.

A *Lutzomyia cruzi* foi identificada como o principal vetor da LV no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul. Sua prevalência é de aproximadamente 80% em relação as demais *Lutzomyias* identificadas e a fêmea é muito semelhante à *L. longipalpis*. Neste estudo, a forma promastigota da *L. chagasi* foi isolada de alguns insetos de *L. cruzi* sugerindo sua participação no ciclo da doença (SANTOS et al, 1998). Mestre e Fontes (2007) também sugerem a participação da *L. cruzi* na transmissão da LV no estado do Mato Grosso.

Apesar destas pesquisas, a *L. longipalpis* ainda sim é considerado o vetor mais importante da LV no Brasil, de acordo com a maior parte da literatura pesquisada, tendo sua presença prevalente em áreas endêmicas do Brasil (CAMARGO-NEVES et al, 2004;

LAISON E RANGEL, 2005; BRASIL, 2006; DUTRA E SILVA et al, 2007; RANGEL E VILELA, 2008; COURTNEY et al, 2009).

Estes flebotomíneos são pequenos, medindo de 1 a 3 mm de comprimento (Figura 2). Possuem o corpo revestido por pelos e são de coloração clara (castanho claro ou cor de palha). São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Estes insetos na fase adulta estão adaptados a diversos ambientes, porém na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética e as fêmeas alimentam-se também de sangue para o desenvolvimento dos ovos. A *L. longipalpis* adapta-se facilmente a variadas temperaturas, podendo ser encontrada ao redor, no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos. Há indício de que o período de maior transmissão de LV ocorre durante e logo após a estação chuvosa, quando há um aumento da densidade populacional do inseto. Sua ação é predominantemente crepuscular e noturna (BRASIL, 2006).



Figura 2. Flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* (BRASIL, 2006; SILVA, 2011).

No município de Teresina, estado do Piauí, local de realização do presente estudo, Dutra e Silva et al. (2007) coletaram em torno de 27.500 fêmeas flebotomíneas de diversas regiões da cidade. Em torno de 6,6% destes insetos foram dissecados e classificados de acordo com seus caracteres morfológicos. Observou-se que 99,67% pertenciam à espécie *L. longipalpis* e apenas 0,33% eram *L. whitmani*.

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), as medidas de controle para a LV estão alicerçadas no diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes, realização de inquéritos sorológicos nas populações caninas e o controle dos insetos vetores. No Brasil o controle do vetorial baseia-se exclusivamente na captura e aplicação de piretróides residuais vinculados à procedência dos casos humanos e ou caninos.

Sendo assim o controle químico teve início no Brasil entre as décadas de 50 e 60, com introdução do diclorofeniltricloetano 5% (DDT) (ALENCAR, 1961), sendo posteriormente



introduzida a utilização de piretróides sintéticos com sua eficácia variável a depender do local de aplicação (intradomiciliar ou peridomiciliar), além da frequência de seu uso (TEODORO et al., 2007).

Em função destes entraves, o controle do vetor através da utilização de coleiras impregnadas com inseticida, para utilização no reservatório canino, tem sido uma ferramenta importante (DAVID et al, 2001; MAZLOUMI GAVGANI, 2002; BRASIL, 2006). No Brasil, poucos tem sido os estudos realizados com a aplicação tópica de piretróides (COURTENAY, 2009) ou através de coleiras impregnadas particularmente com deltametrina (DAVID et al, 2001; OLIVEIRA-LIMA et al, 2002; CAMARGO-NEVES et al, 2004).

Com base nestas informações, a eficácia da coleira LEEVRE foi testada no controle do principal vetor (*L. longipalpis*) transmissor da *L. infantum chagasi*, responsável pela Leishmaniose Visceral, doença de grande importância em saúde pública no Brasil.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da coleira LEEVRE, no controle de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis*, vetores da leishmaniose visceral, em cães experimentalmente infestados.

3. JUSTIFICATIVA

O estudo foi realizado para dar suporte às documentações necessárias para o registro de produto veterinário no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

4. DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Para a elaboração deste estudo, utilizou-se como referência:

- KILLICK-KENDRIX, R. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, v.11, pág.105-111, 1997.
- MOLINA, R.; ESPINOSA-GÓNGORA, C.; GÁLVEZ, R.; MONTOYA, A.; DESCALZO, M.A.; JIMÉNEZ, M.I.; DADO, D.; MIRÓ, G. Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a sopr-on against *Phlebotomus perniciosus*. *Veterinary Parasitology*, 187, pág.529-533, 2012.
- VICH Topic GL9 - Guideline on Good Clinical Practices. CVM/VICH /595/98-Final, London, July, 2000.

A utilização dos animais no estudo foi realizada de acordo com a Lei nº 11.794 (Lei Arouca) de 08 de Outubro de 2008 que estabelece os procedimentos para uso de animais em experimentação científica.

O protocolo foi submetido à Comissão de Ética da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob nº 0101/12, aprovado em 11 de Outubro de 2012.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local e período de realização

O estudo foi realizado nas dependências do canil do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e no Laboratório de Sanidade Animal/LASAN-UFPI, localizado no município de Teresina, Estado do Piauí.

5.2. Animais utilizados no estudo e identificação

Foram recrutados (pré-selecionados) 26 cães do plantel de animais do Laboratório de Sanidade Animal/LASAN-UFPI, aproximadamente dois meses antes do início do estudo (D-75), para coleta de exames e observação do estado clínico geral.

Destes, foram então selecionados 20 cães adultos hígidos no D-42 do estudo, sendo 10 machos e 10 fêmeas, sem raça definida, com idade entre 2 a 4 anos, pesando entre 8 a 18,9kg.

Os animais foram identificados através de colares numerados colocados no pescoço dos animais e através de microchip implantado no subcutâneo. Houve também identificação nas baias coletivas (Figura 3).



Figura 3. Exemplos de identificação dos animais e dos canis coletivos.

5.3. Ambiente e Manejo

Os animais permaneceram em canis coletivos, telados, separados por grupos e por sexo, para as etapas de tratamento e manutenção dos animais, onde permaneceram até o término do ensaio (Figura 4). Os canis estavam distantes uns dos outros, evitando a contaminação cruzada entre grupos e foram limpos duas vezes ao dia durante todo o estudo.



Figura 4. Canil de alojamento de um grupo de animais.

Foi fornecido alimento industrializado adequado às exigências nutricionais da espécie, e água *ad libitum*. Os animais foram vacinados e vermifugados, com produtos comerciais utilizados rotineiramente no local do estudo, na data de recrutamento dos animais (D-75), ou seja, dois meses e meio antes do tratamento e início da etapa experimental.

5.4. Origem e destino dos animais estudados

Os animais foram selecionados do plantel de cães pertencentes ao canil da UFPI, onde permaneceram durante todo o período experimental. Estes animais foram avaliados quanto ao diagnóstico para leishmaniose através de sorologia, parasitológico e cultura no momento de recrutamento dos animais (D-75 ao D-43).

Ao final do estudo, foi realizada uma avaliação clínica e laboratorial final nos animais (sorologia e parasitológico) para diagnóstico de possível contaminação por leishmania. Os animais sadios (negativos para leishmania nos testes laboratoriais) foram destinados à campanha de doação. Apenas um animal do estudo apresentou diagnóstico positivo e foi eutanasiado, conforme recomendação do Ministério da Saúde, como forma de controle do reservatório canino (BRASIL, 2006).

O procedimento de eutanásia teve como base a resolução nº 714, 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Os cadáveres de animais submetidos à eutanásia ou de outros animais que viessem a óbito durante o estudo foram destinados a aterros



sanitários, devidamente licenciados por órgãos ambientais competentes, conforme RDC nº 33 (BRASIL, ANVISA, 2003) e atualizações.

5.5. Critérios de inclusão e exclusão dos animais

5.5.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no D-4 do estudo:

- Animais machos e fêmeas de diferentes idades, em bom estado nutricional;
- Animais hígidos, selecionados por avaliação clínica e hemograma;
- Animais não tratados com antiparasitários nos últimos 60 dias antecedentes ao tratamento experimental (D0);
- Animais com sorologia negativa (Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI e ELISA);
- Animais com diagnóstico parasitológico negativo de linfonodos e medula óssea (citologia e cultura).

5.5.2 Critérios de exclusão dos animais

Os critérios de exclusão foram:

- Animais que apresentassem qualquer doença intercorrente que indicassem comprometimento da saúde;
- Fêmeas que se tornassem prenhes ou lactantes;
- Animais tratados, durante o estudo, com medicações antiparasitárias.

Foram excluídos 2 animais durante o estudo, conforme detalhado no item Eventos Adversos.

5.6. Recrutamento, seleção e alocação dos animais

Foram recrutados 26 animais, de acordo com o peso, sexo, idade e estado geral, no D-75 do estudo através da avaliação de frequência cardíaca, respiratória, avaliação de linfonodos e mucosas, hidratação, estado geral de saúde e exame sugestivo de leishmaniose.

No D-48, foram realizados exames laboratoriais para diagnóstico de leishmaniose: hemograma e bioquímica; exame sorológico para anticorpos (RIFI); exame sorológico (ELISA); diagnóstico parasitológico de medula óssea e linfonodo (citologia e cultura).

Após avaliação dos resultados, 20 animais foram selecionados para o estudo no momento D-42. Todos tiveram diagnóstico negativo para leishmaniose nas análises realizadas, conforme fichas clínicas e laudos laboratoriais.

Quatro dias anteriores (D-4) ao início do tratamento, os 20 animais selecionados passaram por nova avaliação clínica e foram alojados. No dia anterior ao tratamento (D-1), foram alocados em 2 grupos (controle e tratado), distribuídos homoganeamente pelo sexo e peso. Número de animais recrutados: 26, Número de animais selecionados: 20 (10 machos e 10 fêmeas), Número de animais reserva: 4 (2 tratados e 2 controle), Número de animais de iniciaram o experimento: 16, Número de grupos: 2, Grupo Controle: n=8 (4 machos e 4 fêmeas), Grupo Tratado: n=8 (4 machos e 4 fêmeas).

5.7. Seleção de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*

Foram utilizadas fêmeas e machos de flebotomíneos *L. longipalpis*, espécie de maior prevalência na região (99,67%), capturados em áreas de mata e em bairros da cidade de Teresina (PI) nos dias anteriores ao início de cada desafio experimental. Os flebotomíneos foram mantidos no setor de entomologia do Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Federal do Piauí, até o início do estudo.

Para a captura dos insetos adultos foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CDC devidamente instaladas próximas a baias, galinheiros e áreas com matéria orgânica em decomposição. Estas armadilhas foram colocadas a 1,0 m de altura do solo às 18h e recolhidas às 6hs da manhã do dia seguinte. Após recolhimento das armadilhas, estas foram transportadas ao Laboratório para colonização dos insetos. Esse procedimento repetiu-se diariamente durante todo o estudo.

Os insetos foram selecionados visualmente em machos e fêmeas com auxílio de um aspirador automático (Castro) e alocados em potes separados contendo em torno de 60 fêmeas e 20 machos, mantidos em estufa climatizada com temperatura $26 \pm 0,5$ °C e umidade relativa do ar até 80% até a realização do desafio experimental. A presença de insetos machos foi necessária para estimular o instinto natural de repasto sanguíneo das fêmeas, necessário para o desenvolvimento dos ovos. Os machos precisam apenas de uma fonte de carboidrato como energia para sobrevivência (BRASIL, 2006).

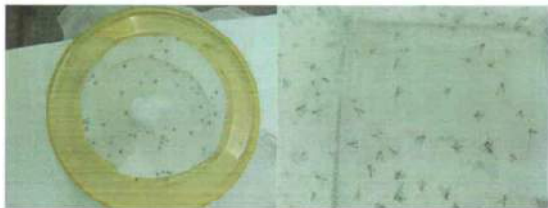


Figura 5. Insetos flebotomíneos utilizados no repasto sanguíneo.

5.8. Tratamento experimental

5.8.1 Formulação LEEVRE:

Propoxur 12 g

Deltametrina 4 g

Veículo q.s.p 100 g

Formulação Placebo:

Coleira placebo, sem impregnação dos ativos.

5.8.2 Dosagem e modo de uso

O tratamento teve início no dia zero (D0) do experimento, onde foram posicionadas as coleiras no pescoço dos animais do grupo Tratado. Os animais do grupo Controle receberam um coleira “placebo”, sem impregnação dos ativos.

A coleira foi retirada de sua embalagem, desenrolada e adaptada ao redor do pescoço do cão de forma justa, sem apertar. A coleira foi passada dentro da fivela plástica, travada nos pinos de abotoar nos 3 furos e cortada a porção excedente.

Julgou-se necessário a utilização de coleira placebo nos animais do grupo controle para garantir que a presença física do material, sem os princípios ativos, não tivesse qualquer influência nas avaliações realizadas. Desta forma, foi possível simular as mesmas condições no grupo controle e tratado, visto que os insetos são extremamente sensíveis e o desafio experimental ocorreu numa situação bem controlada.

Não foram empregados outros tipos de tratamentos antiparasitários, em todos os animais do grupo tratado e controle, ao longo do ensaio. Foi realizado um controle



ambiental, através da utilização de produtos comerciais nas instalações, para evitar a infestação de ectoparasitas no ambiente de estudo, antes do alojamento dos animais.

Qualquer tratamento concomitante ao estudo foi comunicado ao patrocinador e registrado nas fichas em anexo, conforme relatado no item de Evento Adverso.

5.8.3 Grupos experimentais

Foram formados dois grupos experimentais, compostos de 8 animais cada. Todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos de seleção, avaliação clínica e desafio experimental (sedação e repasto de flebotomíneos).

Grupo Controle – animais que receberam a coleira “placebo” no D0, sem impregnação dos ativos da coleira, a qual permaneceu até o término do ensaio.

Grupo Tratado – animais que receberam a coleira LEEVRE no D0, a qual permaneceu durante 182 dias em contato com os animais até a avaliação final do estudo (D+182).

Cada grupo experimental foi então dividido em dois subgrupos de acordo com o sexo para a realização do tratamento e desafio experimentais:

Controle machos: 4 animais

Controle fêmeas: 4 animais

Tratado machos: 4 animais

Tratado fêmeas: 4 animais

A inserção da coleira nos animais e os desafios experimentais foram feitos em dias diferentes e consecutivos para cada um dos subgrupos, sendo realizados respectivamente nos subgrupos controle macho, controle fêmea, tratado macho e tratado fêmea. Isto foi necessário para que cada 4 animais pudessem ser desafiados no mesmo período crepuscular e noturno (das 18 às 24 horas) de cada dia, respeitando o período de maior atividade dos insetos e assim manter o mesmo intervalo de tempo entre os desafios.

5.9. Delineamento do estudo

Foram selecionados 20 cães por meio de pesagem, avaliação clínica, hemograma e exames laboratoriais específicos. Foram incluídos animais com sorologia negativa para anticorpos anti IgG *anti-Leishmania* e diagnóstico parasitológico negativo através da não



visualização do parasita na forma amastigota na cultura do material obtido de aspirado de medula óssea e de linfonodo.

Quatro dias anteriores ao tratamento (D-4), os animais foram pesados e avaliados clinicamente. No D-1 foram alocados nos grupos Controle e Tratado, de acordo com o sexo e peso.

No dia do tratamento D0, os 20 animais selecionados do grupo Tratado e Controle receberam as coleiras de tratamento e placebo respectivamente, conforme o seu porte físico. No entanto, apenas 16 cães, sendo 8 animais do grupo Tratado e 8 animais do grupo Controle foram direcionados para início do estudo. Os demais animais (2 controle e 2 tratados) permaneceram como animais reserva, utilizando a coleira placebo e LEEVRE respectivamente como forma de manter a liberação do produto.

Os animais foram tratados em dias diferentes, subdivididos pelo grupo e sexo, para que o desafio experimental pudesse ser realizado sequencialmente e fosse mantido o intervalo de desafios.

Foram realizados desafios para avaliar a eficácia do produto nos dias (D+7), (D+21), (D+49), (D+77), (D+105), (D+133), (D+161), (D+182). Nestas mesmas datas, os animais foram submetidos à avaliação clínica antes do procedimento.

Em cada momento do desafio, os animais foram sedados, colocados em uma caixa de vidro e desafiados frente a 60 fêmeas e 20 machos de *Lutzomyia longipalpis* por um período de 50 minutos. Durante este procedimento, o ambiente permaneceu escuro (sem janelas e sem iluminação) e climatizado com ar condicionado em temperatura constante. A caixa de vidro foi construída especificamente para estes tipos de testes e delineamentos de estudos.

Foram realizadas avaliações da eficácia do produto no controle dos flebotomíneos através da contagem de insetos fêmeas após o período de desafio e sua avaliação pela taxa de mortalidade e alimentação (ingurgitamento de sangue).

Os animais foram acompanhados durante todo o período de ensaio para observação de parâmetros clínicos e detecção de possíveis reações adversas.

Ao término do estudo, os animais em experimentação passaram por uma nova avaliação clínica e laboratorial para verificação do parasita *leishmania* e foram adequadamente destinados.

5.10. Procedimentos Experimentais

5.10.1 Avaliação clínica

A avaliação dos parâmetros clínicos foi realizada no D-75, no D-4 e em todos os momentos anteriores ao desafio experimental.

Foi avaliado o estado geral dos animais, inspeção da pele e fâneros, além da palpação abdominal e dos gânglios linfáticos, onde foi observada a existência ou não de sinais clínicos sugestivos de LVC, segundo Ferrer (1999). Os parâmetros avaliados foram: frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, mucosas, linfonodos, hidratação, estado geral, sinais de descamação/dermatite (espelho nasal e orelha, onicogribose).

5.10.2 Exames laboratoriais

Diagnóstico sorológico – Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-Leishmania

No momento depois do recrutamento (D-48) e ao final do estudo (D+193), foram coletados aproximadamente 5,0 ml de sangue das veias cefálica e/ou safena de todos os animais, com seringa e agulha, e acondicionados em tubos de ensaio estéreis, com e sem anticoagulante (Figura 7). Posteriormente, os tubos de ensaio foram centrifugados 5.000 rpm por 2 minutos, para obtenção do plasma e do soro, os quais foram armazenados em tubos de polipropileno a 20°C até a realização do exame sorológico (RIFI).

A RIFI foi realizada de acordo com técnica padronizada por Oliveira et al (2008). Inicialmente, o soro foi diluído em tampão fosfato (PSB) na diluição 1:40, em seguida as amostras foram colocadas sobre as lâminas previamente sensibilizadas com promastigotas de *Leishmania* como antígeno e incubadas a 37°C por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram submetidas a três lavagens em PSB por imersão, de cinco minutos cada. Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente foram adicionadas 10µL/poço do anticorpo *anti-IgG* espécie com isotiocianato de fluoresceína diluído a 1:32 em PSB. Após 30 minutos a 37°C as lâminas foram novamente lavadas 3 vezes com PSB e após a secagem estas foram montadas com laminula e posteriormente observadas em microscópio equipado para fluorescência. Foram considerados positivos os animais com títulos a partir de 1:80.

Diagnóstico sorológico – ELISA

Foi realizado o teste ELISA no início (D-48) e ao final do estudo (D+193). É um ensaio imunoenzimático e consiste na reação de anticorpos presentes no soro com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e o soro diluído é adicionado posteriormente. A presença de anticorpos específicos no soro vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre



quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado sororreagente é aquele que apresenta o valor da densidade ótica igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte (Cut-Off) do resultado do controle negativo.

Diagnóstico sorológico – DPP (Dual Path Platform) Leishmaniose Canina

Este teste foi realizado apenas ao final do estudo (D+193), após coleta de sangue dos animais. É um teste imunocromático rápido para detecção de anticorpos *anti-leishmania*, baseado em informação qualitativa, desenvolvido pela Fiocruz/Bio-manguinhos. Utiliza uma proteína recombinante K39 como antígeno. Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *L. chagasi* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de leishmania (*Leishmania donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*).

Diagnóstico parasitológico – biópsia de medula óssea

Após anti-sepsia do local nos momentos D-48 e D+193, foram realizadas a biópsia de medula óssea, por punção medular na crista do osso esterno, utilizando-se seringas de 20ml estéril acopladas a agulhas 40x12. Do material puncionado, foram realizados esfregaços em lâminas de vidro para microscopia, que após secagem, foram corados pelo método de coloração Panótico e examinados em microscópio óptico com objetiva de 100x para pesquisa de formas amastigotas de Leishmania. Os exames parasitológicos foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Federal do Piauí, no início e ao final do estudo.

Diagnóstico parasitológico – citologia aspirativa de linfonodo

Foi realizada nos momentos D-48 e D+193, a citologia aspirativa do linfonodo poplíteo esquerdo ou direito, com auxílio de agulha hipodérmica 0,55x19 mm, após devida assepsia do local. Do material puncionado, foram realizados esfregaços em lâminas de vidro para microscopia, que após secagem, foram corados pelo método de coloração Panótico e examinados em microscópio óptico com objetiva de 100x para pesquisa de formas amastigotas de Leishmania. Os exames parasitológicos foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Federal do Piauí, no início e final do estudo.

Cultura

Uma alíquota da biópsia de medula óssea e do aspirado de linfonodo foram utilizadas para cultura em tubos contendo o meio NNN (Novy, Mac-Neal, Nicolle). Estas alíquotas foram inoculadas e incubadas a uma temperatura entre 22 e 26°C.

As culturas foram realizadas apenas no início (D-48) e ao final (D+193) do estudo e foram examinadas semanalmente para a detecção das formas promastigotas, seguindo metodologia conforme Maia e Campino (2008).

5.10.3 Procedimento de desafio e avaliação

O procedimento de desafio experimental ocorreu no período noturno, com início do primeiro animal ao final da tarde, em torno das 17-18 horas. Foram divididos quatro subgrupos de desafio, de acordo com o sexo e tratamento, em quatro dias consecutivos. Optou-se pelo início com animais do grupo controle para evitar a contaminação da caixa de vidro com o produto em teste.

Os desafios foram realizados com quatro machos e quatro fêmeas do grupo controle nos dois primeiros dias, respectivamente, e posteriormente com quatro machos e quatro fêmeas do grupo tratado nos dois dias seguintes.

Para a realização do desafio experimental ou repasto sanguíneo, os animais foram sedados com a associação de acepromazina na dose de 0,5 mg/kg (Acepran 0,2% -Vetnil), cloridrato de cetamina na dose de 5,0 mg/kg (Quetamina injetável- Vetnil) e cloridrato de xilazina na dose de 3,0 mg/kg (Calmiun xilazina 2%) conforme figura 9. Os momentos do início da sedação e repasto estão detalhados nas fichas clínicas.



Figura 9. Avaliação clínica e contenção do animal para início do procedimento de sedação.

Depois de sedados, os animais foram colocados um a um, individualmente, dentro de uma caixa de vidro de tamanho de 1,0 metro de comprimento x 1,0 metro de largura x 54 cm de altura, contendo uma face telada. Nas faces de vidro existiam pontos com tecido elástico para possibilitar a entrada das mãos de uma pessoa para a liberação e captura dos insetos, conforme figura 10.



Figura 10. Caixa de vidro para desafio experimental.

Após colocar o animal dentro da caixa de vidro, foram liberadas em torno de 60 fêmeas e 20 machos de flebotomíneos, os quais permaneceram no interior da caixa de vidro por 50 minutos, em contato com os animais sedados (Figura 11). Os insetos estavam sem alimentação por um período mínimo de 24 horas.

A caixa de vidro permaneceu em uma sala sem luminosidade (sem janelas) e climatizada com ar condicionado em temperatura ambiente constante.



Figura 11. Animais sedados e liberação de flebotomíneos para desafio experimental.

Após os 50 minutos, todos os insetos machos e fêmeas, vivos e mortos foram recolhidos com auxílio de um capturador de Castro (aspirador). Apenas as fêmeas foram contadas e postas em frascos plásticos recobertos por uma tela (filó), identificados para cada animal do estudo.

Após esse procedimento, os cães foram retirados da caixa, acompanhados na recuperação da sedação e levados ao canil.

Os flebotomíneos vivos permaneceram nos frascos plásticos, e foram observados nos períodos de 12 e 24 horas após o desafio. Após este momento, foram dissecados para

observações de ingurgitamento através de microscopia óptica, em lâminas de vidro com as respectivas lamínulas.

As fêmeas mortas foram recolhidas da caixa (aspirador- figura 12), contadas e também colocadas em lâminas de vidro com as respectivas lamínulas imediatamente para observação do ingurgitamento.



Figura 12. Recolhimento das fêmeas de flebotomíneos mortas, distribuídas pelo piso da caixa, após o desfilio com o produto F005 (grupo tratado).

Todas as fêmeas de flebotomíneos (vivos ou mortos) foram avaliadas com relação ao ingurgitamento de sangue, ou seja, se houve alimentação, através de avaliação visual e microscópica. A fêmea alimentada foi aquela que apresentou qualquer quantidade de sangue vivo (vermelho) no trato digestivo, após esmagamento contra lâmina de vidro, conforme figura 13.



Figura 13. Avaliação do ingurgitamento dos flebotomíneos, antes e após o esmagamento com lamínula de vidro. Visualização a olho nu e ao microscópio com a observação de sangue no interior do inseto.

5.10.4 Análise dos dados

Percentual de mortalidade (Eficácia Inseticida)

Com relação ao percentual de mortalidade, as fêmeas de flebotomíneos foram contadas a fim de determinar o número total de sobreviventes e de mortos, após cada desafio experimental, independente se estavam alimentados ou não.

As contagens individuais foram somadas e transformadas em porcentagem, em relação ao número total de insetos avaliados em cada desafio, excluindo os insetos perdidos. Alguns insetos podem não ser recuperados após o desafio experimental, ficando mortos e impregnados na pelagem dos animais.

O percentual de mortalidade foi avaliado pela seguinte fórmula (MOLINA et.al, 2012):

$$\frac{\text{Número de fêmeas vivas/sobreviventes no grupo controle} - \text{número de fêmeas vivas/sobreviventes no grupo tratado}}{\text{Número de fêmeas vivas/sobreviventes no grupo controle}} \times 100$$

Percentual de alimentação (Eficácia na proteção contra picadas)

Com relação ao percentual de proteção contra picadas, todas as fêmeas de flebotomíneos (vivas ou mortas) foram avaliadas, em microscopia óptica para observação da presença de sangue, para determinar se estavam alimentadas ou não.

As contagens individuais foram somadas e transformadas em porcentagem, em relação ao número total de insetos avaliados em cada desafio, excluindo os insetos perdidos.

O percentual de proteção contra picadas foi determinado através da seguinte fórmula (MOLINA et.al., 2012):

$$\frac{\text{Número de fêmeas alimentadas no grupo controle} - \text{número de fêmeas alimentadas no grupo tratado}}{\text{Número de fêmeas alimentadas no grupo controle}} \times 100$$

6. CRONOGRAMA DO ESTUDO

Quadro 1. Cronograma de atividades do estudo e momentos de execução.

Momento	Atividades
D-75	Recrutamento dos animais Avaliação Clínica
D-48	Exames laboratoriais
D-42	Seleção e Identificação
D-4	Avaliação Clínica
D0	Início Tratamento
D+7	Avaliação Clínica Desafio Experimental
D+21	
D+49	
D+77	
D+105	
D+133	
D+161	
D+182	
D+182	Retirada do produto
D+193	Exames laboratoriais Encerramento do estudo

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início do estudo, todos os animais selecionados apresentaram resultados negativos para presença de anticorpos IgG *anti-Leishmania* e no teste ELISA, e negativos no diagnóstico parasitológico tanto na visualização direta do parasita na forma amastigota como nas culturas (promastigota) do material obtido de aspirado de medula óssea e de linfonodo. No término do estudo, apenas um animal apresentou-se positivo no exame sorológico DPP e o mesmo foi eutanasiado conforme recomendação do Ministério da Saúde, como forma de controle do reservatório canino (BRASIL, Ministério da Saúde, 2006).

Foram realizados desafios experimentais nos dias 7, 21, 49, 77, 105, 133, 161 e 182 após a inserção das coleiras LEEVRE. Após o desafio experimental de cada animal, foi contado o total de fêmeas vivas ou mortas e o total de fêmeas ingurgitadas (alimentadas) ou não.

O total de fêmeas vivas/mortas foi avaliado logo após o término do desafio experimental. Com relação à avaliação da alimentação dos insetos, as fêmeas mortas foram avaliadas quanto ao seu ingurgitamento imediatamente após o desafio. As fêmeas vivas foram avaliadas após 12 e 24 horas do término do procedimento e foram somadas aos insetos já avaliados para compor o total de alimentação. Todas as contagens individuais foram descritas nas fichas clínicas do estudo.

As contagens individuais foram somadas, dentro de cada grupo, e transformadas em porcentagem em relação ao número total de fêmeas recuperadas após cada desafio (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Soma das contagens (porcentagem) de fêmeas de flebotomíneos avaliados, vivos, mortos, alimentados ou não após cada momento de desafio experimental, no Grupo Controle.

Momento (dias)	Insetos avaliados	Insetos vivos	Insetos mortos	Insetos alimentados	Insetos não alimentados
7	480	479 (99,79)	1 (0,21)	432 (90,00)	48 (10,00)
21	477	474 (99,37)	3 (0,63)	423 (88,68)	54 (11,32)
49	474	465 (98,10)	9 (1,90)	399 (84,18)	75 (15,82)
77	468	459 (98,08)	9 (1,92)	408 (87,18)	60 (12,82)
105	461	446 (96,75)	15 (3,25)	404 (87,64)	57 (12,36)
133	454	438 (96,48)	16 (3,52)	386 (85,02)	68 (14,98)
161	449	413 (91,98)	36 (8,02)	369 (82,18)	80 (17,82)
182	432	432 (100,00)	0 (0)	357 (82,64)	75 (17,36)

Tabela 5. Soma das contagens (porcentagem) de fêmeas de flebotomíneos avaliados, vivos, mortos, alimentados ou não após cada momento de desafio experimental, no Grupo Tratado.

Momento (dias)	Insetos avaliados	Insetos vivos	Insetos mortos	Insetos alimentados	Insetos não alimentados
7	480	0 (0)	480 (100,0)	42 (8,75)	438 (91,25)
21	480	0 (0)	480 (100,0)	29 (6,04)	451 (93,96)
49	480	0 (0)	480 (100,0)	75 (15,62)	405 (84,38)
77	468	0 (0)	468 (100,0)	28 (5,98)	440 (94,02)
105	445	11 (2,47)	434 (97,53)	40 (8,99)	405 (91,01)
133	433	27 (6,24)	406 (93,76)	36 (8,31)	397 (91,69)
161	380	12 (3,16)	368 (96,84)	28 (7,37)	352 (92,63)
182	390	110 (28,21)	280 (71,79)	31 (7,95)	359 (92,05)



Na coluna de insetos avaliados, é possível verificar que mesmo inserindo uma quantidade padrão de 60 fêmeas por animal, a quantidade recuperada e avaliada foi muito variável. Os insetos perdidos durante o procedimento provavelmente ficaram mortos e fixados na pelagem dos animais, conforme também observado nos estudos de Killick-Kendrick et al. (1997) e David et al. (2001).

Observa-se que a quantidade de insetos avaliados nos momentos 161 e 182 dias do grupo tratado foi menor, pois foram desafiados apenas 7 animais nestes momentos, devido à exclusão de 2 animais do estudo e inserção de um animal reserva. A exclusão ocorreu devido ao aparecimento de uma lesão cutânea no local de manutenção do produto. De qualquer forma, a avaliação dos resultados não teve interferência pois foram avaliados através do percentual obtido.

Eficácia Inseticida

Pela análise do grupo controle, mais de 95% dos insetos permaneceram vivos durante todo o procedimento, com exceção apenas do momento de 161 dias com 91,98%. Tal variação é natural devido à utilização de colônias de campo, muito diversificadas com relação à sua idade e resistência. Desta forma, refletimos o uso da coleira em uma condição de campo demonstrando uma melhor acurácia da resposta observada.

Em contrapartida, na avaliação do grupo tratado, a taxa de mortalidade foi muito alta, ficando em 100% até 77 dias de estudo e decaindo lentamente, permanecendo acima de 90% para as demais datas de avaliação até os 161 dias de uso do produto e com 71,79% aos 182 dias. Este comportamento indica ação do produto no desencadeamento da morte das fêmeas flebotomíneas. Tais variações podem ser visualizadas no gráfico 1.

Segundo Killick-Kendrick et al. (1997) a taxa de mortalidade contra *Phlebotomus perniciosus* variou de 21 a 60% para todos os momentos desde a 1ª semana até a 34ª semana de cães com coleira plástica impregnada com 40g/g de deltametrina, ficando muito abaixo do encontrado neste estudo com a coleira LEEVRE.

O mesmo produto foi avaliado contra *Lutzomyia longipalpis* e encontrou uma variação de 30,3 a 96% de mortalidade dos insetos até 245 dias de avaliação (DAVID et al, 2001). Na comparação com a coleira LEEVRE, também a base de deltametrina, esta apresentou resultados acima de 90% de mortalidade dos insetos até 161 dias de estudo, enquanto o produto semelhante obteve o mesmo índice apenas até 56 dias. Com 182 dias de uso da coleira LEEVRE, a taxa de mortalidade ficou em torno de 71,79% enquanto o estudo em análise mostrou uma taxa de 54,35%.

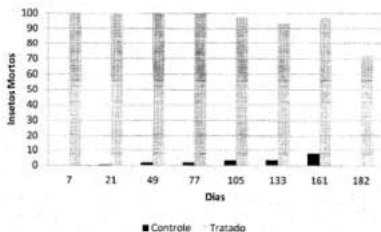


Gráfico 1. Porcentagem de insetos mortos após tratamento com a coleira LEEVRE, durante o período experimental.

Para avaliação da eficácia inseticida utilizou-se um valor percentual, calculado através da soma dos valores individuais, em relação ao número de insetos fêmeas recuperados dentro de cada grupo experimental, nos diversos momentos da avaliação, de acordo com a fórmula abaixo.

Os resultados estão apresentados na tabela 6 e no gráfico 3.

$$\text{Eficácia Inseticida} = \frac{\text{Número fêmeas vivas no grupo controle} - \text{número de fêmeas vivas no grupo tratado}}{\text{Número de fêmeas vivas no grupo controle}} \times 100$$

Tabela 6. Porcentual de eficácia da coleira LEEVRE no controle de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*.

Momento (dias)	Eficácia Inseticida (%)	Eficácia Proteção contra Picadas (%)
7	100,00	90,28
21	100,00	93,19
49	100,00	81,43
77	100,00	93,14
105	97,45	89,74
133	93,53	90,24
161	96,56	91,03
182	71,79	90,38



Na análise da eficácia inseticida, observa-se que a coleira LEEVRE apresentou resultados acima de 90% de mortalidade até 161 dias de estudo, com exceção do último desafio experimental (182 dias) em que porcentagem ficou em torno de 71,79%. O produto manteve a liberação dos ativos durante um período de 26 semanas. Este efeito inseticida auxilia no controle da população de flebotomíneos, reduzindo a prevalência de leishmaniose de áreas endêmicas, controlando também a incidência da doença na população humana.

No estudo de David et al (2001), a eficácia inseticida de uma coleira impregnada com deltametrina, contra *Lutzomyia longipalpis*, atingiu seu pico máximo de 93,75% com 56 dias de estudo e chegou a 50,46% aos 189 dias após o uso do produto. Em revisão feita por Vulpiani et al. (2011), relata-se um efeito na mortalidade de flebotomíneos variando de 30 a 67% com o uso de coleiras impregnadas com piretróides.

Com isso, podemos verificar que a coleira LEEVRE teve resultados superiores aos encontrados na literatura, visualizando no gráfico 3.

Eficácia na proteção contra picadas

Com relação à análise do ingurgitamento dos insetos, as tabelas 3 e 4 mostram uma inversão de resultados de alimentados nos grupos. Os valores permanecem praticamente constantes, variando de 82,18 a 90,00% a taxa de insetos alimentados no grupo controle e apenas de 6,04 a 15,63% a taxa de alimentação no grupo tratado durante os 182 dias de estudo. Tal observação demonstra a redução evidente de picadas durante todo o período de utilização do produto em teste (Gráfico 2).

Estudo realizado por Killick-Kendrick et al. (1997), apenas 0 a 12% dos flebotomíneos (*Phlebotomus perniciosus*) recapturados haviam se alimentado em cães com coleiras de deltametrina em comparação com 55 a 95% que haviam se alimentado sobre os cães sem coleira, durante 238 dias de estudo. O mesmo produto foi avaliado contra flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e apresentou uma variação de 0 a 18,8% de ingurgitamento nos animais tratados durante 245 dias de estudo (DAVID et al.,2001).

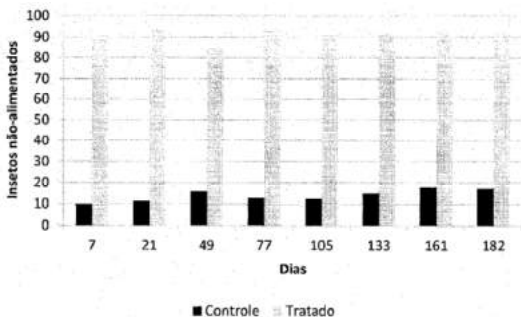


Gráfico 2. Porcentagem de insetos não alimentados após tratamento com LEEVRE durante o período experimental.

$$\text{Eficácia Proteção contra picadas} = \frac{\text{Número de fêmeas alimentadas no grupo controle} - \text{número de fêmeas alimentadas no grupo tratado}}{\text{Número de fêmeas alimentadas no grupo controle}} \times 100$$

Com relação à eficácia na proteção contra picadas segundo a fórmula acima, os dados mostram que poucos insetos se alimentaram no grupo tratado em relação ao grupo controle, durante todo o período do estudo. Observa-se que a eficácia se manteve em torno de 90% durante os seis meses, com exceção do momento de 49 dias que ficou em 81,43% de proteção (Tabela 6 e Gráfico 3). Esta variação é natural, devido ao longo período do estudo, em diferentes condições climáticas e variação na condição das colônias de campo coletadas a cada período. Molina et al (2012) relata que a flutuação de temperatura diária pode ter influência neste processo.

Na grande maioria dos momentos do estudo, a taxa de alimentação ficou praticamente constante tanto no grupo tratado como no controle, demonstrando um comportamento similar dos insetos e indicativo de um delineamento experimental adequado. Observa-se o mesmo comportamento no estudo de David et al. (2001), no qual o efeito inseticida diminuiu consideravelmente e mais rápido que o efeito protetor contra as picadas, que se mantém constante ao longo do tempo.

Em estudo de David et al. (2001), a proteção contra picadas variou de 82,68 a 100% com 245 dias de estudo. Já a coleira LEEVRE protegeu a grande maioria dos cães contra picadas e chegou a obter médias muito próximas e satisfatórias (81,43 a 93,19%) com 182 dias de

estudo. Em revisão feita por Vulpiani et al. (2011), coleiras de piretróides apresentaram um efeito protetor de 72 a 90% contra picadas de insetos transmissores da Leishmania. A eficácia na proteção contra picadas reduz o risco de contaminação dos cães, evitando a picada do inseto vetor da leishmaniose.

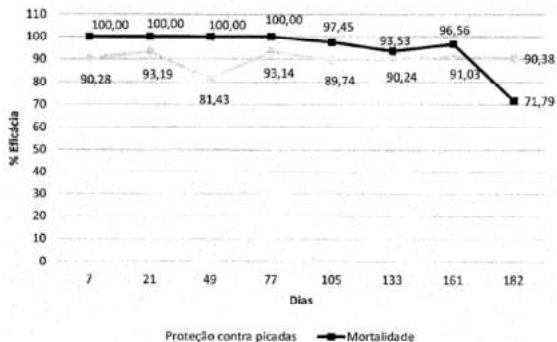


Gráfico 3. Percentual de eficácia de LEEVRE no controle de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*.

Apesar de alguns insetos conseguirem se alimentar, estudo realizado por Killick-Kendrick (1999), apenas 1% dos flebotomíneos conseguiu sobreviver após a primeira hematofagia; com isso a circulação do parasita *Leishmania* no cão (reservatório principal) reduziu substancialmente e a transmissão do parasita foi interrompida.

Até os momentos de 77 dias do estudo de LEEVRE, todos os insetos ingurgitados estavam mortos logo após o desafio experimental. No entanto, no desafio realizado aos 105 dias de estudo, alguns flebotomíneos alimentados permaneceram rodoopiando após o término do procedimento, desorientados no chão da caixa de vidro e visualmente afetados pela ação do produto. Estes foram observados e morreram em torno de 30 minutos depois. Tais insetos foram considerados mortos para o cálculo da eficácia.

Os métodos de controle indiretos da Leishmaniose Visceral, tais como o uso de coleiras e produtos de aplicação tópica, são ferramentas eficientes no controle de vetores transmissores da doença, através da eficácia inseticida e na proteção contra picadas. A ação

do inseticida e impregnação do ativo na pele do animal é suficiente para desorientar e irritar os flebotômíneos resultando na redução das picadas e provocando sua morte. Estudos de campo foram realizados com o objetivo de verificar o impacto do uso em massa destas formulações, na incidência da leishmaniose. Foram reportadas reduções significativas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Vulpiani et al., 2011).

Um estudo realizado na região hiper-endêmica para Leishmaniose Visceral na Itália mostrou 100% de eficácia na prevenção de cães tratados com coleiras impregnadas com 10% imidacloprid e 4,5% de flumetrina. De 63 animais tratados, nenhum se infectou com o parasita por um período superior a 8 meses de avaliação. Já, de 61 animais controle, 45,1% tornaram infectados no mesmo período. Isto indica uma estratégia confiável e sustentável em reduzir a incidência da doença nos cães e consequentemente o risco para os humanos (OTRANTO et al., 2013). Este mesmo autor resumiu na tabela 7, resultados de estudos de campo com produtos à base de piretróides tópicos (coleiras ou *spot on*) no controle da incidência de LV em cães. Os animais não tratados foram utilizados como controle de prevalência da doença na região durante vários meses. Foi possível constatar taxas de proteção contra a doença em torno de 50 a 100%.

Tabela 7. Eficácia na proteção contra Leishmaniose Visceral em estudos de campo, com diferentes produtos piretróides tópicos (OTRANTO E DANTAS, 2013).

Product/active ingredient	Formulation	Study site	Study duration (months)	Treated dogs	Untreated animals (controls)	Efficacy (%)
Imidacloprid 10% and permethrin 0%	Spot-on	Italy	12 months	300*, 304*	219 (3,8%)	93%*, 90,3%*
Permethrin 00%	Spot-on	Brazil	4 months	230	160 (7,4%)	50%
Permethrin 00%	Spot-on	Italy	2 seasons	120	180 (10%)	84%
Deltamethrin 4%	Collars	Italy	2 seasons	119	180 (10%)	84%
Imidacloprid 10% and permethrin 00%	Spot-on	Italy	24 months	71	56 (47,8%)	100%
Delamethrin 4%	Collars	Italy	2 seasons	364	371 (38,0%)	60-88%
Delamethrin 4%	Collars	Italy	2 seasons	60	60 (41,2%)	51%
Delamethrin 4%	Collars	Tunisia	2 seasons	42	30 (10,8%)	100%
Delamethrin 4%	Collars	Iran	6 months	354	408 (16,8%)	54%*
Delamethrin 4%	Collars	Brazil	12 months	130	87 (17,6%)	50%
Imidacloprid 10% and flumethrin 4,5%	Collars	Italy	24 months	63	61 (35,2%)	100%

No presente estudo, em condições de desafio experimental para avaliação da eficácia inseticida do produto e na sua ação repelente, foi possível verificar que LEEVRE protegeu os cães contra a maioria das picadas dos flebotômíneos (81-93% - média de 89,93%) e manteve um efeito inseticida (71-100% - média de 94,91%) por um período de 26 semanas (182 dias). Desta forma, conclui-se que o risco de infecção dos animais e do ser humano por leishmaniose pode ser reduzido com uso deste produto, através do controle de vetores transmissores.

8. EVENTOS ADVERSOS

Os animais foram observados diariamente durante todo o estudo quanto à ocorrência de eventos adversos. Os casos foram relatados nas fichas clínicas do estudo. Dois animais do grupo tratado apresentaram lesões de pele na região de aplicação do produto.

Um animal apresentou alopecia e eritema na região do pescoço, próximo ao local de manutenção da coleira, aos 93 dias do estudo. O animal foi acompanhado por avaliação clínica, observado diariamente. Realizou-se um tratamento concomitante com água oxigenada e pomada contendo alantoína e óxido de zinco no local da lesão, duas vezes ao dia. A coleira não foi retirada e houve regressão e melhora do quadro após 6 dias. Aos 141 dias de uso do produto, este animal apresentou recidiva do quadro de lesão no pescoço com alopecia e eritema. Foi instituído novamente o mesmo tratamento tópico e após 10 dias do início da lesão, o animal foi excluído do estudo. A coleira foi retirada, e o animal foi acompanhado até a completa regressão do quadro após 7 dias.

Um animal apresentou alopecia e eritema de grau leve na região do pescoço, próximo ao local de manutenção da coleira, aos 93 dias do estudo. O animal foi acompanhado por avaliação clínica, observado diariamente. Realizou-se um tratamento concomitante com água oxigenada e pomada contendo alantoína e óxido de zinco no local da lesão, duas vezes ao dia. A coleira não foi retirada e houve regressão e melhora do quadro após 5 dias. Aos 139 dias de uso do produto, este animal apresentou recidiva do quadro de lesão no pescoço com alopecia e eritema. Foi instituído novamente o mesmo tratamento tópico e após 12 dias do início da lesão, o animal foi excluído do estudo. A coleira foi retirada, e o animal foi acompanhado até a completa regressão do quadro após 6 dias.

A presença de lesões de pele pode ser observada em produtos tópicos à base de piretróides. Maroli et al. (2001) relatam que coleiras com deltametrina empregadas em cães, ocasionaram episódios de eritema, vômito e sialorréia, com uma incidência muito pequena (0,6%). Molina et al. (2012) também relataram o aparecimento de prurido, alopecia e áreas de inflamação em cães tratados com produto tópico à base de permetrina.

9. CONCLUSÃO

Pela análise da porcentagem de insetos vivos no grupo controle, pode-se concluir que o delineamento do estudo foi adequado, pois mais de 90% dos insetos permaneceram vivos durante todo o desafio experimental e no decorrer do estudo.

O efeito inseticida do produto pode auxiliar no controle da população de flebotomíneos, reduzindo a prevalência de leishmaniose e consequentemente auxiliando também no controle da doença.

De acordo com os resultados apresentados, podemos concluir que LEEVRE manteve a liberação dos ativos e foi eficaz no controle de vetores da leishmaniose (*Lutzomyia longipalpis*) durante 26 semanas, com mortalidade média dos insetos em torno de 95% (94,91%) e proteção média contra picadas em torno de 90% (89,93%).

10. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. R.; ARAGÃO, F. R.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, Y. M.; LIRA, R. A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L.C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na Região metropolitana do Recife. *Revista Clínica Veterinária*. nov/dez, 2007.

ALENCAR, J. E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 3, n. 4, p. 175-180, 1961.

ALVES, W.A; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997, *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.20, n.1, p. 259-265, 2004.

ALVES, L.C. FAUSTINO, M.AG. Leishmaniose visceral canina, Manual da Schering-Plough, São Paulo, 2005.14p.

ASHFORD, D. A., et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal of Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*. v. 30, p. 1269-1281, 2000.



ourofino

BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C.; PRATA, A.; LOROSA, E. S.; FIÚZA, J. A.; GONÇALVES, C. M.; PAULA, K. M.; DIAS, E. S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotômíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 5, p.421-425, 2005.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução n°714, de 20 de junho de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°33, de 25 de fevereiro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, 2007.

BRASIL. Lei n° 11.794 (Lei Arouca). Estabelece os procedimentos para uso de animais em experimentação científica, prezando o bem estar animal. 08/10/2008.

BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; MAIA, F.C.L. et al. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 58, p.768-775, 2006.

CAMARGO-NEVES, V.L.F., DE RODAS, L.A.C. & JUNIOR, C.P. Avaliação da efetividade da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para o controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo: resultados preliminares. *Boletim Epidemiológico Paulista*, 12, 1-11, 2004.



ourofino

CARVALHO, M.R.; VALENÇA, H.F.; SILVA, F.J.; PITA-PEREIRA, D.; PEREIRA, T.A.; BRITTO, C.; BRAZIL, R.P.; FILHO, S.P.B. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Tropica*, 116, 108-110, 2010.

CIARAMELA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 25, n. 5, p. 358-369, may. 2003.

COURTENAY, O.; KOVACIC, V; G O M E S, P. A. F.; GARCEZ, L. M.; QUINNELL, R. J.. A long-lasting topical deltamethrin treatment to protect dogs against visceral leishmaniasis *Medical and Veterinary Entomology* 23, 245-256, 2009.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101 (1), 117-118, 2006.

DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK-KENDRICK, R.; OLIVEIRA LIMA, J. W. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent ant feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 96, n. 6, p. 839-847, 2001.

DUTRA e SILVA, J.G.; WERNECK, G.L.; PIRES e CRUZ, M.S.; COSTA, C.H.N.; MENDONÇA, I.L. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. Em Teresina, Piauí, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 23 (7), 1715-1720, 2007.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. v. 20, n.11, p.524-530, 2004.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From *Canine Leishmaniasis: an update Proceedings of a Canine Leishmaniasis*. Forum, Barcelona (Sitges), p.28-31, 1999.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.



ourofino

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M.P.; CADIERGUES, M.C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, v.11, pág.105-111, 1997.

KILLICK-KENDRICK, R. Anti-feeding effects of synthetic pyrethroids against phlebotomine sand flies and mosquitoes, and the prospects of controlling canine leishmaniasis with deltamethrin-impregnated ProtectorBands (Scalibor®). In R Killick-Kendrick, *Canine Leishmaniasis: an Update, Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona (Sitges), 28-31 January, 1999*, Wiesbaden: Hoechst Roussel Vet, p. 82-88, 1999.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n.8, p. 811-827, 2005.

MAIA, C.; CAMPINO, L. *Methods for diagnosis fo canine leishmaniasis and immune response to infection. Veterinary Parasitology*, 159, pag.274-287, 2008.

MAROLI, M.; M IZZONI, 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. *Medical and Veterinary Entomology*. V. 15, p. 358-363, 2001.

MAZLOUMI GAVGANI, A. S.; HODJATI, H.; MOHITE, H.; DAVIES, C. R. Impact of insecticide impregnated dog collars on rate of zoonotic visceral leishmaniasis infection in children: matched community-based trial in Iran. *The Lancet*, v. 360, n. 9330, p. 374-379, 2002.

MESTRE, G.L.C.; FONTES, C.J.S. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Rev Soc Bras Med Tropical*, 40 (1), 42-48, 2007.

MILES, M. A.; J.A. VEXENAT, J. H.; CAMPOS, F.; CASTRO, J.A.F. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies. From *Canine Leishmaniasis: an update Proceedings of a Canine Leishmaniasis. Forum, Barcelona (Sitges)*, p. 46-53, 1999.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato



ourofino

Grosso. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n.4, p. 337-340, 2006.

MOLINA, R.; ESPINOSA-GÓRGORA, C.; GÁLVEZ, R.; MONTOYA, A.; DESCALZO, M.A.; JIMÉNEZ, M.I.; DADO, D.; MIRÓ, G. Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. Veterinary Parasitology, 187, pág.529-533, 2012.

MONTEIRO, A.R.P. Estudo Epidemiológico da leishmaniose canina na zona arrábida. Lisboa, 2010.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. Waltham Focus, V.9, n.2, p.16-24, 1999.

OLIVEIRA-LIMA, J.W., SOUSA, R.N., TEIXEIRA, M.J., POMPEU, M., KILLICKENDRICK, R. & DAVID, J.R. Preliminary results of a field trial to evaluate the value of deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis in northeast Brazil. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Intervet, Sevilla, Spain, pp. 91-9, 2002.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; CAPRARIIS, D.; DI PAOLA, G.; TARALLO, V.D.; LATROFA, M.S.; LIA, R.P.; ANNOSCIA, G.; BREITSHWERDT, E.B.; 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 (www.plosone.org), 8(2), pág 1-8, 2013.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. Trends in parasitology, v.29 (7), 2013.

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D. L. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural, v. 28, n. 3, p. 501- 505, 1998.

RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Caderno Saúde Pública, 24 (12), 2948-2952, 2008.

REITHINGER, R.; LAMBSON, B. E.; BARKETI, D. C.; COUNIHAN, H.; ESPINOZA, J. C.; GONZALEZ, J. S.; DAVIES, C.R. Leishmania (*Viannia*) spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene, v.96, p.76-78, 2002.



oufino

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, v.12, 315-317, 1998.

SILVA, R.A. Contribuição ao entendimento da transmissão da leishmaníase visceral no município de Fortaleza, Ceará. Universidade Estadual do Ceará, 2011.

SLAPPENDEL, R. J.; et al. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quartely*, The Hague, n. 10, p. 1-16, 1988.

TEODORO, U.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L. P.; KÜHL, J. P.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; MONTEIRO, W. M.; NEITZKE, H. C. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos no norte do Estado do Paraná, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 23, n. 11, p. 2597-2604, 2007.

VIANNA, M. S. R. Sobre a transmissão da leishmaníose visceral. *Saude-Rio: Secretaria Municipal de Saúde*, Rio de Janeiro, 19 dez. 2001.

VICH Topic GL9 - Guideline on Good Clinical Practices. CVMP/VICH /595/98-Final, London.

VULPIANI M.P.; IANNETTI, L.; PAGANICO, D.; IANNINO, F.; FERRI, N. Methods of controlo f the *Leishmania infantum* dog reservoir: state of the art. *Veterinary Medicine International*, 13p., 2011.