

Prevención de la leishmaniosis canina en una zona hiperendémica utilizando una combinación al 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina.

Domenico Otranto^{1*}, Filipe Dantas-Torres^{1,2}, Donato de Caprariis¹, Giancarlo Di Paola¹, Viviana D. Tarallo¹, Maria S. Latrofa¹, Riccardo P. Lia¹, Giada Annoscia¹, Edward B. Breitshwerdt³, Cinzia Cantacessi^{1,4}, Gioia Capelli⁵, Dorothee Stanneck⁶

1 Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, Valenzano, Italia, 2 Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Fiocruz-PE), Recife, Pernambuco, Brasil, 3 Intracellular Pathogens Research Laboratory, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, Estados Unidos de América, 4 Center for Biodiscovery and Molecular Development of Therapeutics, James Cook University, Cairns, Australia, 5 Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratory of Parasitology, Legnaro, Italia, 6 Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Alemania

Resumen

Antecedentes: Los perros son el principal reservorio de *Leishmania infantum*, el agente de la leishmaniosis visceral zoonótica humana. Este estudio investigó la eficacia de un collar de matriz polimérica conteniendo una combinación al 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina como nueva medida profiláctica para prevenir las infecciones por *L. infantum* en perros jóvenes de una zona hiperendémica del sur de Italia, con el fin de aumentar las estrategias de control actuales contra la leishmaniosis.

Metodología / hallazgos principales: El estudio se llevó a cabo en **124 perros jóvenes**, de los que **63 recibieron el collar (Grupo A)** mientras que **61 se mantuvieron sin tratar (Grupo B)**, desde marzo-abril de 2011 hasta marzo de 2012. Se recogieron muestras de sangre y piel en el inicio (abril de 2011) y en el primer, segundo, tercer y cuarto periodo de seguimiento (julio y septiembre de 2011, noviembre de 2011 y marzo de 2012, respectivamente). Se obtuvieron muestras de médula ósea y de conjuntiva en el inicio y en el cuarto periodo. Se llevaron a cabo análisis serológicos, citológicos y moleculares para detectar la presencia de *L. infantum* en los distintos tejidos recogidos. Al final del ensayo, ninguno de los perros del Grupo A fue positivo para *L. infantum* en ninguno de los periodos de seguimiento, mientras que 22 perros del Grupo B presentaron infección (tasa de densidad de incidencia = 45,1%); por lo tanto, la combinación al 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina presentó una eficacia del 100% en la prevención de la infección por *L. infantum* en perros jóvenes antes de su primera exposición al parásito en una zona hiperendémica de leishmaniosis canina.

Conclusiones: El uso de collares con 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina confirió una protección de larga duración contra la infección por *L. infantum* en perros ubicados en una zona hiperendémica, representando así una estrategia fiable y sostenible para la disminución de la frecuencia y diseminación de esta enfermedad entre la población canina, lo que en última instancia conseguirá una reducción de los riesgos asociados para la salud humana.

Cita: Otranto D, Dantas-Torres F, de Caprariis D, Di Paola G, Tarallo VD, et al. (2013) Prevention of Canine Leishmaniosis in a Hyper-Endemic Area Using a Combination of 10% Imidacloprid/4.5% Flumethrin. PLoS ONE 8(2): e56374. doi:10.1371/journal.pone.0056374.

Editor: Stuart Alexander Ralph, University of Melbourne, Australia.

Recibido el 1 de noviembre de 2012; Aceptado el 8 de enero de 2013; Publicado el 25 de febrero de 2013.

Copyright: © 2013 Otranto et al. Este es un artículo de acceso libre distribuido bajo los términos de la Licencia de Atribución Común Creativa, que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio y sin restricciones, siempre que se citen el autor y la fuente originales.

Financiación: Este proyecto fue financiado por Bayer Animal Health GmbH (Alemania). Los patrocinadores no tienen ningún papel en el diseño del estudio, recogida de datos y análisis, así como tampoco en la decisión de su publicación o preparación del manuscrito.

Declaración de intereses: El estudio fue apoyado por Bayer Animal Health GmbH (Alemania) y la Dr. Dorothee Stanneck es una empleada de Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Alemania. No existen patentes, productos en desarrollo o productos comercializados que declarar. Esto no altera el cumplimiento de los autores de todas las políticas PLOS ONE sobre intercambio de datos y materiales, tal y como se detalla en la guía para autores en línea.

* Correo electrónico: domenico.otranto@uniba.it.

Introducción

Leishmania infantum es un importante protozoo parásito transmitido por vectores artrópodos que origina la leishmaniosis visceral y cutánea en perros y humanos en países del sur de Europa, África, Oriente Medio y Lejano Oriente, así como en América Central y del Sur, con aproximadamente 500.000 nuevas infecciones registradas cada año [1,2]. En el sur de Europa, incluyendo Turquía, la leishmaniosis originada por *L. infantum* es endémica, con un total de 3950 nuevos casos en humanos registrados cada año [3]. Los perros desempeñan un papel importante como principal reservorio de la leishmaniosis visceral zoonótica [4]. De hecho, la leishmaniosis canina (CanL) se encuentra entre las enfermedades parasitarias transmitidas por vectores más diseminadas que afectan a perros de todos los continentes, excepto Oceanía [5]. En zonas en las que los vectores competentes, es decir, los mosquitos flebótomos del género *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (en América), se encuentran extendidos, las infecciones humana y canina se encuentran estrechamente asociadas [6,7] y los “puntos calientes” de la infección corresponden a zonas cuyas condiciones ambientales y climáticas son ideales para el desarrollo de los vectores artrópodos [8,9]. Por lo tanto, durante las últimas décadas se han realizado esfuerzos considerables hacia el control de la prevalencia e incidencia de la leishmaniosis canina tanto en zonas endémicas como no endémicas, así como en el desarrollo de estrategias de control nuevas y coste-efectivas contra esta devastadora enfermedad. Estudios recientes han descrito la difusión de la leishmaniosis canina por *L. infantum* en zonas previamente no endémicas (p. ej. desde el norte de Argentina hasta el norte de los Estados Unidos y algunas provincias del sur de Canadá) [4,10]. De este modo, la enfermedad se ha extendido desde las regiones del sur del Mediterráneo hasta el norte de Europa [11,12]. La leishmaniosis canina es muy prevalente en perros de Sudamérica y en las regiones mediterráneas, siendo asintomáticos hasta el 60% de los perros infectados, lo que hace que las estimaciones actuales de prevalencia de la infección basadas en la detección de signos clínicos sean poco fiables tanto en las zonas endémicas como en las hiperendémicas [13,14].

Como consecuencia de la complejidad eco-epidemiológica implicada en la vía de transmisión de *L. infantum*, el control de la leishmaniosis canina ha demostrado ser un reto y ninguna de las estrategias propuestas (p. ej. el sacrificio selectivo de perros en Brasil o la pulverización ambiental con insecticidas) ha proporcionado resultados satisfactorios hasta ahora [4]. Por ejemplo, la pulverización de las casas con diclorodifeniltricloroetano (DDT) para luchar contra los mosquitos flebótomos en Brasil no ha tenido éxito [15], probablemente debido a que el insecticida no se aplicó en el periodo correcto del año [16] y a la imposibilidad de alcanzar los lugares naturales de cría de estos insectos [17]. Además, debido a los efectos secundarios ambientales y a los riesgos para la salud humana, los organoclorados [p. ej., DDT y hexacloruro de benceno (BHC)] han sido gradualmente sustituidos por los piretroides sintéticos [16–18]. El uso de piretroides con propiedades repelentes en formulaciones spot-on [19] o como collares impregnados [20] ha representado un enfoque útil y coste-efectivo para reducir el riesgo de infección por *L. infantum* en perros en zonas endémicas. En un estudio previo [21], el uso de collares para perros impregnados con deltametrina consiguió una tasa de protección contra las infecciones caninas por *L. infantum* del 50% y del 86%, respectivamente durante dos estaciones consecutivas de transmisión en Europa [22]. Una combinación al 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina en una formulación spot-on fue también efectiva en la reducción de la infección por *L. infantum* en poblaciones amplias de perros en residencias [19,23], así como de diversas enfermedades transmitidas por garrapatas (p. ej., babesiosis y trombocitopenia cíclica canina causada por *Babesia canis* y *Anaplasma platys*, respectivamente), tanto en animales autóctonos como en perros beagle no expuestos previamente e introducidos experimentalmente en un ambiente de residencia junto con perros nativos infestados por garrapatas [24].

Recientemente se ha desarrollado para perros y gatos un collar de matriz polimérica conteniendo una combinación al 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina (Seresto, Bayer Animal Health), en lo sucesivo denominado como “collar”, con propiedades tanto repelentes como insecticidas contra pulgas y garrapatas [25,26]. Estudios previos de eficacia han demostrado protección contra infestaciones por pulgas y garrapatas durante un periodo de ocho meses, atribuyéndose esto tanto al sistema de matriz de liberación lenta del collar como a la acción sinérgica entre el piretroide flumetrina y el neonicotinoide imidacloprid [25,26]. A pesar de estos resultados prometedores, no se dispone de datos que describan la actividad repelente de esta formulación en collar contra los mosquitos flebótomos ni su eficacia en la prevención de la leishmaniosis canina en zonas endémicas. En el presente estudio, tratamos esta falta de conocimiento investigando la eficacia de este collar en la prevención de la infección por *L. infantum* en perros jóvenes que viven en una zona hiperendémica del sur de Italia.

Materiales y métodos

• Declaración ética

El estudio se llevó a cabo según los principios de Buenas Prácticas Clínicas (VICH GL9 GCP, 2000 <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/vich/059598en.pdf>), en la guía para el análisis y evaluación de la eficacia de sustancias antiparasitarias para el tratamiento y la prevención de infestación por garrapatas y pulgas en perros y gatos (EMEA/CVMP/005/00, 2000 <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/ewp/000500en.pdf>) y en la guía sobre principios estadísticos para ensayos clínicos veterinarios (CVMP/816/00, 2000 www.emea.eu.int/pdfs/vet/ewp/081600en.pdf). El diseño del estudio y los procedimientos experimentales fueron aprobados y autorizados por el Ministerio de Salud Italiano (número de autorización DGSA nº 0001997; 04/02/2011).

• Área del estudio

El ensayo se llevó a cabo entre marzo de 2011 y octubre de 2012 en un refugio privado de animales en Putignano, provincia de Bari, región de Apulia, Italia (latitud 40°51 N, longitud 17°7 E, altitud 372 m sobre el nivel del mar). El refugio está gestionado por una asociación ciudadana privada. La aparición de mosquitos flebótomos en el lugar del estudio fue controlada durante los tres años anteriores [27]; la incidencia anual durante los dos años anteriores fue del 47,6% para la infección por *L. infantum* en la población nativa de perros [19]. Se permitió que aproximadamente 200 perros, no incluidos en el protocolo del estudio, vagaran libremente por los alrededores con el fin de mantener las condiciones naturales de infección existentes en el centro del estudio.

• Diseño del estudio y procedimiento experimental

Este estudio de campo se diseñó para evaluar la eficacia de los collares en la prevención de la infección por *L. infantum* en perros. En el día de inclusión, se aplicó un collar alrededor del cuello de cada perro del Grupo A, adaptándose su longitud al tamaño del perro mediante un mecanismo de cierre de trinquete. Se cortó el extremo sobrante para ajustar la longitud necesaria y evitar que otros perros mordieran el extremo suelto. Los perros de menos de 6 meses de edad fueron asignados a uno de los dos grupos lanzando una moneda al aire. Grupo A – perros tratados con los collares el día 0 y que continuaron con el tratamiento hasta marzo de 2012; Grupo B – perros control no tratados. La homogeneidad de los dos grupos con respecto a los datos epidemiológicos de los perros (es decir, sexo, peso y longitud del pelo) se evaluó utilizando un ensayo chi-cuadrado y ANOVA unilateral el día de la inclusión. Los collares se aplicaron a los perros del Grupo A según su peso (intervalo de dosis del collar: ≤8 kg: collar pequeño; >8 kg: collar grande). Durante el estudio los collares fueron reemplazados cuando fue necesario en función del aumento de peso de los perros. Se registró cualquier collar perdido / quitado, volviéndose a colocar de inmediato. Todo collar dañado de forma irreparable fue sustituido por uno nuevo, en dos días.

Según las guías EMEA/CVMP/005/00-Rev2, cada perro fue individualmente identificado utilizando microchip y fotografía. Debido a la visibilidad de los collares, el personal implicado en la manipulación directa de los animales supo si el animal estaba recibiendo el tratamiento o si pertenecía al grupo control; no obstante, el personal del laboratorio no fue informado de la composición de los grupos del estudio, no indicándose en los tubos y secciones de muestras el grupo al que pertenecía el animal.

En su inclusión, entre marzo y abril de 2011 (inicio), se registraron en formularios individuales todos los datos asociados con cada perro (es decir, sexo, edad, peso y longitud del pelo). Cada perro fue examinado clínicamente, recogiendo para su análisis muestras de suero, sangre, piel, médula ósea y torundas de la conjuntiva. En el primer, segundo y tercer periodo de seguimiento (julio, septiembre y noviembre de 2011, respectivamente) y en el cuarto periodo de seguimiento (marzo de 2012, análisis final) se obtuvieron biopsias cutáneas y torundas de la conjuntiva de todos los perros incluidos en el estudio, mientras que las muestras de médula ósea se obtuvieron únicamente en el inicio y en el cuarto periodo de seguimiento (Tabla 1). Los perros se examinaron clínicamente cada diez días durante el estudio y en cada periodo de seguimiento. Los signos clínicos indicativos de leishmaniosis canina (p. ej. lesiones oculares, lesiones cutáneas, pérdida de peso y linfadenomegalia) se registraron en el registro médico individual de cada perro.

En marzo de 2012, al final del periodo de tratamiento, los perros del grupo A y del grupo B que no fueron adoptados por nadie no recibieron tratamiento hasta octubre de 2012, permitiendo de ese modo la exposición a *L. infantum* durante la siguiente estación de mosquitos flebótomos. En octubre de 2012, se realizó una recogida

completa de muestras en los otros 111 animales (62 del Grupo A y 49 del Grupo B, respectivamente). Este análisis de seguimiento, incluyendo serología, citología y análisis mediante PCR, se llevó a cabo siete meses después de la extracción de los collares (marzo de 2012) para determinar la incidencia de leishmaniosis canina entre los perros que recibieron o no el collar (Grupos A y B, respectivamente) durante el año anterior y que no recibieron tratamiento durante la siguiente estación del mosquito (de mayo a octubre de 2012).

Tasa de densidad de incidencia (IDR) de leishmaniosis en perros de los grupos con collar (A) y control sin collar (B).

Perros incluidos	Fecha muestra	Nº de perros en la cohorte		Nº de casos nuevos ^a		Perros-meses de seguimiento		Tasa de densidad de incidencia/año (IC 95%)	
		A	B	A	B	A	B	A	B
Inicio	Marzo-abril 2011	63	61	-	-	-	-	-	-
Seguimiento 1	Julio 2011	63	61	0	0	175,8	136,6	0	0
Seguimiento 2	Septiembre 2011	62	53	0	1	163,1	140,3	0	8,55 (1,02–16,08)
Seguimiento 3	Noviembre 2011	62	52	0	10	127,7	107,1	0	100
Seguimiento 4 -análisis final-	Marzo 2012	62	51	0	10	251,1	174,4	0	68,82 (56,08–81,52)
Total				0	21	717,6	558,4	0	45,13 (31,44–58,76)

a = perros positivos para uno o más análisis parasitológico, serológico y/o por PCR.
doi:10.1371/journal.pone.0056374.t001

• Animales experimentales, alojamiento y tamaño de la muestra

De los 176 perros jóvenes incluidos en el estudio, 52 (29,5%) murieron durante las seis primeras semanas como consecuencia de un brote de parvovirus canino (datos no mostrados). Los otros 124 perros de ambos sexos, de distintas razas, con una edad inferior a 6 meses y alojados en el refugio de animales se incluyeron en el estudio. Todos los perros presentaron un estado de salud aceptable, cumpliendo los criterios de inclusión veterinarios en el inicio, día 0 de inicio (SD 0). Se vacunó a cada perro mediante dos inyecciones intramusculares (con un intervalo de dos semanas) de Duramune® DAPPI+LC (Fort Dodge Animal Health, Italia) contra patógenos caninos comunes (parvovirus canino, adenovirus tipo 2, virus distemper, *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*) y cada perro fue desparasitado utilizando una combinación de febantel / pirantel / praziquantel (Drontal plus; Bayer AG, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los perros se alojaron en aulas de malla metálica (n = 21) de aproximadamente 10 m x 20 m ubicadas cerca de paredes de piedra, conocidas por representar un lugar de reposo natural para los mosquitos. Las jaulas de los animales tratados y no tratados se separaron al menos 2 metros mediante vallas. Todos los perros se mantuvieron bajo las mismas condiciones antes, durante y después del estudio y recibieron pienso comercial una vez al día, mientras que el acceso al agua fue libre. Sólo se extrajeron del estudio aquellos perros cuya salud general se deterioraba, presentaban lesiones cutáneas relacionadas con el producto o morían. Durante el estudio no se permitió el uso de otros ectoparasiticidas en los animales del estudio ni en el ambiente, excepto cuando las circunstancias representaban una amenaza para el bienestar de los animales (p. ej. infestación grave por pulgas o garrapatas).

• Procedimientos de diagnóstico

Las muestras de sangre (2 ml) se recogieron de las venas braquial o yugular y se transportaron hasta la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Bari (Italia) en viales de ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA). El mismo día, las muestras se centrifugaron a 1.678 g durante 10 minutos, separándose el suero y almacenándose en tubos Eppendorf etiquetados individualmente a -20 °C hasta su análisis. Las muestras de médula ósea se obtuvieron mediante aspiración de la cresta ilíaca utilizando agujas Rosenthal (calibre 16 o 18), almacenándose a -20 °C en tubos Eppendorf individuales con 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) hasta su procesamiento molecular. Además, se prepararon extensiones de muestras de médula ósea en portaobjetos para examen citológico a fin de detectar

amastigotes de *L. infantum*. Se recogieron muestras de tejido cutáneo de aproximadamente 0,5 cm² de la región intraescapular y se procesaron tal y como se ha descrito previamente [19,23]. Las torundas conjuntivas se transfirieron a tubos conteniendo solución salina fisiológica hasta la llegada al laboratorio y se almacenaron a -20 °C.

Se llevó a cabo un ensayo inmunofluorescente indirecto con anticuerpos (IFAT) utilizando promastigotes de *L. infantum zymodeme* MON1 como antígeno tal y como se ha descrito en otro sitio [19]. Las muestras se clasificaron como positivas cuando pudo observarse un citoplasma claro o fluorescencia en la membrana con promastigotes utilizando una dilución umbral de 1:80; titulándose el suero positivo hasta obtener un resultado negativo. Las preparaciones citológicas de las extensiones de médula ósea se examinaron al microscopio mediante tinción con MGG Quick Stain (Bio Optica, Italia) a fin de detectar la presencia de amastigotes.

Se llevó a cabo la técnica de PCR para la amplificación del DNA de *Leishmania* en las muestras de médula ósea, torundas conjuntivas y en las muestras de piel. El DNA total se extrajo utilizando el micro kit QIAampDNA (Qia-gen, GmbH, Hilden, Alemania) y el kit de purificación de DNA genómico (Gentra Systems, Minnesota, EE.UU.), respectivamente, amplificándose un fragmento de DNA minicircular de kinetoplasto de *L. infantum* utilizando el cebador MC1/MC2 [14]. Los amplicones se separaron utilizando geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (Gellyphor, Italia), determinándose su tamaño mediante comparación con marcadores en la Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Lituania). Los geles se fotografiaron utilizando un sistema de documentación digital (Gel Doc 2000, BioRad, Reino Unido).

• Procedimientos de examen ambiental

Se evaluó la densidad de la población de mosquito flebótomo de mayo a octubre de 2011 y 2012 utilizando tiras adhesivas recubiertas con aceite de ricino (30 cm x 21 cm) durante periodos de 24 horas. Los mosquitos flebótomos se recogieron dos veces al mes tras su primera aparición y a continuación cada 3 semanas hasta la recogida del último insecto. Los mosquitos flebótomos se contaron y se identificaron a nivel de especie según Marloli et al [28]. Durante el periodo del estudio se registraron los valores de temperatura media y de humedad relativa mediante un registrador de datos (HD 206 Delta OHM, Padova, Italia) cada 30 minutos, con un total de 48 registros por día. A continuación, se calculó la media de la temperatura (°C) y de la humedad relativa (%) registradas durante todo el día (24 h) y la noche (21:00 a 4:00).

• Análisis estadístico

El tamaño mínimo de la muestra (n = 49) se calculó utilizando el programa informático WinEpi (<http://www.winepi.net/uk/index.htm>) para calcular las diferencias entre las proporciones (es decir, la incidencia) de dos poblaciones, utilizando los siguientes supuestos: (i) proporción esperada en el Grupo A (es decir, animales tratados) = 5%; (ii) incidencia esperada en el Grupo B (animales no tratados) = 15%; (iii) potencia = 85%; (iv) nivel de confianza = 95%. Para superar la posible pérdida de animales durante el estudio, en cada grupo se incluyeron al menos 60 perros en lugar de 49 (63 en el Grupo A y 61 en el Grupo B). Además, la incidencia de infecciones por *L. infantum* se determinó mediante la tasa de densidad de incidencia (IDR) [23,29], calculada del siguiente modo: IDRs = número de perros positivos para *L. infantum* / número de perros-mes de seguimiento (es decir, el número de meses entre una evaluación y la siguiente para cada perro con riesgo de infección por *L. infantum*). Las diferencias entre las tasas de incidencia en los Grupos A y B se calcularon utilizando el ensayo de Yates corregido ÷2. Los perros analizados una vez (p. ej. perdidos o muertos) no contribuyeron al cálculo de la incidencia, mientras que los perros de los que se obtuvieron muestras al menos dos veces contribuyeron al cálculo de la IDR con el número de meses que permanecieron en el estudio. También se calculó la tasa anual sin tratar (calculada considerando los resultados del ensayo al final del estudio).

El análisis de la eficacia del collar en la prevención de la leishmaniosis canina se basó en la población, que cumplió razonablemente el protocolo, y se evaluó basándose en la protección del animal con respecto a la infección por *L. infantum* durante el periodo de riesgo. La infección se diagnosticó en cada periodo de seguimiento y se calculó utilizando la siguiente fórmula: % de protección = (% de animales positivos en el Grupo control - % de animales positivos en el grupo tratado / % de animales positivos en el Grupo control) x 100. En este estudio, un "perro positivo" se definió como cualquier perro positivo en la citología, serología (título de anticuerpos > 1:80) o PCR para *L. infantum* en uno o más ensayos diagnósticos, incluyendo por tanto todos los perros con evidencias que apoyaran la exposición a mosquitos flebótomos con resultado de transmisión de *L. infantum*, independientemente de si la infección había progresado a enfermedad.

Resultados

Los animales de los grupos con collar ($n = 63$; Grupo A) y control ($n = 61$; Grupo B) fueron homogéneos ($p > 0,05$) en términos de sexo, edad, peso y longitud del pelo. Tras la inclusión en el estudio, 9 perros (7,2%) murieron poco después del segundo punto temporal de seguimiento (uno del Grupo A y 8 del B), mientras que dos perros del Grupo B murieron en el tercer y cuarto periodo de seguimiento, respectivamente. De los 124 perros inicialmente evaluados con respecto a serología, parasitología y análisis molecular, sólo uno (0,06%) fue positivo para *L. infantum* (basándose en la amplificación mediante PCR del DNA del parásito a partir de una muestra de piel). Este perro (Grupo A) permaneció en el mismo recinto junto con otros tres perros del mismo grupo, aunque no se consideró en el cálculo de la incidencia.

En la Tabla 1 se muestran las IDR para cada grupo en los sucesivos puntos temporales de seguimiento. Ninguno de los perros del Grupo A pasó a ser positivo para *L. infantum*, mientras en 21 perros del Grupo B (IDR = 45,1%) se diagnosticó infección por *Leishmania* determinada mediante resultado positivo en al menos uno de los tres ensayos realizados (es decir, serología, citología o PCR) en el primer, segundo, tercer y último periodo de seguimiento. De los 51 perros del Grupo B disponibles en el último periodo de seguimiento, 18 fueron positivos para *L. infantum*, dando como resultado una incidencia anual sin tratar del 35,3%. En la Tabla 2 se muestran los resultados de serología, citología y PCR de distintos tejidos para cada perro positivo. Ninguno de los perros fue positivo en el primer periodo de seguimiento (junio) y sólo un perro fue positivo en el segundo periodo (septiembre de 2011), mientras que en tercer periodo de seguimiento (noviembre de 2011) diez perros fueron positivos en el análisis serológico. De estos, siete también fueron positivos mediante PCR de muestras de la piel. Veinte de los 21 perros (véase Tabla 2) permanecieron positivos en uno o más de los análisis en el cuarto (final) periodo de seguimiento. Todos estos perros fueron seropositivos, nueve fueron positivos en el análisis mediante PCR de la médula ósea y, de estos, seis fueron también positivos en el análisis mediante PCR de muestras cutáneas; se detectaron amastigotes en el examen citológico de la médula ósea de tres perros. Todos los perros positivos en la PCR realizada con las torundas conjuntivas menos uno fueron también positivos en la PCR de médula ósea, indicando de este modo una infección diseminada. Al final del periodo final de seguimiento los títulos de anticuerpos fueron altos (oscilando entre 1:160 y 1:1.240) en todos los perros que fueron positivos en la PCR de médula ósea. Además, el perro 17 tuvo un título de anticuerpos de 1:1.240 y mostró resultados positivos en la citología y en la PCR tanto de piel como de conjuntiva (Tabla 2).

Cinco (27,8%) de los 18 perros que fueron positivos en el análisis serológico y en dos ensayos diagnóstico adicionales (Tabla 2) mostraron signos clínicos (es decir, linfadenomegalia, dermatitis furfurácea, onicogriposis, depresión y pérdida de peso, diarrea) en abril de 2012 (Figura 1) con anomalías hematológicas consistentes principalmente en anemia, leucocitosis, neutrofilia con desviación a la izquierda, linfocitosis, monocitosis, esofinofilia, trombocitopenia, hipoalbuminemia e hipergammaglobulinemia. Ningún perro analizado del Grupo A fue positivo para *Leishmania* durante el estudio, obteniéndose una eficacia de protección final del 100% en los animales con collar.

Los collares se sustituyeron en los perros jóvenes en distintos momentos (8 a los 3 meses, 35 a los 6 meses y 20 a los 8 meses). Aunque la sustitución se debió principalmente al aumento del peso corporal ($n = 46$; 73%), en algunos casos ($n = 17$; 27%) se necesitó un segundo collar debido a la pérdida del collar durante las peleas o los juegos. Cuatro perros necesitaron un tercer collar a los 1,3 meses de la segunda sustitución y dos de ellos destruyeron repetidamente el collar, necesitando por tanto un cuarto (en 1,3 meses) y un quinto (en 1,1 meses) collar. De estos, un perro necesitó otras dos sustituciones del collar (con una separación de 2,3 y 2,1 meses, respectivamente). Debido a la elevada presión de garrapatas en el ambiente y en los animales en el Grupo B, en junio de 2011 y en agosto de 2012 se autorizó, respectivamente, un tratamiento ambiental en el exterior de los recintos que alojaban a los perros del Grupo B con Bayticol (flumetrina) y un tratamiento "en los animales" con Frontline Combo (fipronil y metopreno).

Tras el final del periodo de tratamiento (marzo de 2012), 111 animales (62 del Grupo A y 49 del Grupo B) permanecieron sin tratar durante la siguiente estación de mosquitos flebótomos. De los 111 perros incluidos en el estudio, 8/62 del Grupo A (12,9%) y 29/49 del Grupo B (59,2%) fueron positivos en octubre de 2012 para *L. infantum*, lo que significa una incidencia global para el año 2012 del 20,6% (19 nuevos casos de los 92 perros negativos en marzo de 2012) para *L. infantum*, siete meses después de la extracción de los collares.

En los dos años, los mosquitos flebótomos aparecieron primero durante la última semana de mayo, cuando la temperatura aumentó y la humedad relativa disminuyó, recogiendo la mayoría de los ejemplares de mosquito en julio. La última recogida de mosquitos flebótomos se produjo a mediados de octubre de 2011 y al final de septiembre de 2012. Durante estos dos años, la especie identificada con más frecuencia fue *Sergentomya minuta* (66,6%),

seguida de *Phlebotomus perniciosus* (15,1%), *Phlebotomus neglectus* (8,8%) y *Phlebotomus papatasi* (0,23%). El resto de especies fue identificado como *Phlebotomus* spp. (9,3%) debido a su deteriorado estado. La mayoría de los ejemplares de *P. perniciosus* se recogieron en agosto de 2011 y julio de 2012, cuando se registraron la temperatura media mensual más alta y una humedad relativa media mensual baja.

Resultados en el IFAT (se indica el título de dilución más alto), examen citológico y resultados de la PCR para piel, médula ósea y torundas conjuntivas de perros positivos en los periodos de seguimiento y en el periodo final.

Perros	Septiembre 2011	Noviembre 2011		Marzo 2012				
	Serología	Serología	PCR	Citología	Serología	PCR		
			Piel			Piel	Médula ósea	Torundas conjuntivas
Perro 1	-	-	-	-	-	+	-	-
Perro 2*	-	-	-	+	1:320	+	+	-
Perro 3	-	-	-	-	-	+	-	-
Perro 4	-	-	-	-	1:160	+	+	-
Perro 5	-	1:80	+	-	1:160	-	-	-
Perro 6	-	-	-	+	1:320	+	+	-
Perro 7	-	1:80	-	+	1:80	-	-	-
Perro 8*	-	1:80	+	+	1:160	-	-	+
Perro 9	-	-	-	-	1:160	+	-	-
Perro 10	-	-	-	-	1:320	-	+	-
Perro 11	-	1:80	+	-	1:640	-	+	+
Perro 12	-	1:80	+	-	1:80	-	-	-
Perro 13	-	1:80	-	-	-	-	-	-
Perro 14	-	1:80	+	-	-	-	-	-
Perro 15	-	-	-	-	1:160	+	+	+
Perro 16	-	-	-	-	-	+	-	+
Perro 17*	-	1:80	+	+	1:1240	+	+	+
Perro 18*	-	1:80	+	-	1:160	+	+	+
Perro 19*	-	+	-	-	1:320	-	+	+
Perro 20	+	-	-	-	-	-	-	-
Perro 21	-	-	-	-	1:80	+	-	-

*Los animales que mostraron alteraciones clínico-patológicas que sugerían infección por *Leishmania infantum* se encuentran indicados mediante un asterisco.
doi:10.1371/journal.pone.0056374.t002

Discusión

El presente estudio presenta los resultados de la primera investigación a gran escala de la eficacia de una combinación al 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina en una formulación en collar para la prevención de una de las enfermedades zoonóticas más importantes transmitidas por artrópodos en perros de todo el mundo. **Esta combinación demostró ser segura y 100% eficaz en la prevención de la infección por *L. infantum* en perros jóvenes tras su primera exposición al agente etiológico de leishmaniosis canina en un área hiperendémica.** Los perros recibieron tratamiento según su peso en aumento, sustituyéndose los collares en caso necesario debido al crecimiento del animal, la pérdida del collar o al llegar al final del periodo de eficacia establecido de 8 meses. El tiempo que los animales llevaron un único collar osciló entre un mínimo de 3 meses ($n = 8$ individuos) y un máximo de 6 ($n = 35$) o incluso 8 ($n = 20$) meses. En consecuencia, en el 87,3% ($n = 55$) de los animales con collar se estudió la eficacia protectora del collar contra *L. infantum* durante un periodo de 6 a 8 meses. Basándose en el conocimiento actual de la dinámica estacional de los mosquitos flebótomos [27], así como en los datos aquí mostrados, la duración de la protección conferida por un único collar se prolonga durante toda una estación del mosquito en el sur de Italia. **La prolongada eficacia de la combinación al 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina está muy probablemente asociada al hecho de que la matriz del collar permite una liberación uniforme de los principios activos a una concentración constante [16,25,26], a diferencia de los collares con deltametrina [20,21,30].**

Mientras que ninguno de los perros que recibió el collar (Grupo A) fue infectado por *L. infantum*, en los perros sin collar (Grupo B) se registraron valores de IDR tan altos como el 45,1%. Esta alta incidencia difiere de las observaciones previas realizadas en esa misma área, siendo aproximadamente 3 veces superiores a la incidencia previamente registrada en los perros con dueño (9,5% [31]) y en los perros de residencias (13,6%) [23], respectivamente. Sin embargo, la incidencia de la infección por *L. infantum* detectada mediante técnicas parasitológicas, serológicas y moleculares, fue similar a la descrita en dos estudios anteriores realizados en la misma residencia (IDR = 44,4%) [19], lo que confirma la persistencia de la actividad de los mosquitos en este lugar. La alta endemicidad entre la población canina de esta zona podría también inferirse por la aparición de signos indicativos de leishmaniosis (es decir, dermatitis furfúrea, onicogriposis, letargia, mal estado físico, anorexia y linfadenomegalia) en cinco de los 18 (27,7%) perros del Grupo B tras la exposición a los mosquitos flebótomos durante sólo una estación (marzo de 2012). Estos perros también mostraron anomalías de laboratorio compatibles con leishmaniosis canina (anemia, eosinofilia, trombocitopenia, hipoalbuminemia e hipergammaglobulinemia y, en dos casos, azotemia). **Ninguno de los perros con collar sufrió seroconversión, pasó a ser positivo en la PCR o mostró signos clínicos indicativos de leishmaniosis canina, lo que puede atribuirse a la actividad anti-alimentación de flumetrina. De hecho, se sabe que este compuesto reduce el número de picaduras de insecto y, a su vez, la exposición a la infección,** previniendo de este modo una tendencia hacia una respuesta inmune no protectora y al desarrollo de la enfermedad [32].

La tasa de protección global contra leishmaniosis canina fue mayor que la calculada en los estudios realizados utilizando collares con deltametrina (un máximo del 86%) en el sur de Italia [14,24,30,33], donde se habían registrado incidencias de infección tras exposición de hasta el 91,7% [34]. En este estudio también se evaluó la seguridad del collar; el mecanismo de trinquete de cierre de seguridad integral del collar fue primordial para garantizar la seguridad del producto, especialmente en los perros jóvenes de la residencia alojados en grupos en el mismo recinto, permitiendo ensanchar el collar hasta la siguiente ranura [25,26] evitando de ese modo accidentes durante el juego y la lucha. El número registrado de pérdidas de collar (27%) pudo asociarse con la alta actividad y actitud en el juego de los animales jóvenes, así como con el primer celo de las hembras, y las peleas relacionadas con el apareamiento entre los machos confinados en el mismo ambiente. Dos perros destrozaron repetidamente el collar, precisando hasta siete sustituciones. En conjunto, incluso en presencia de una elevada densidad de animales en un ambiente confinado, la tasa de pérdida de collares fue menor que la registrada en estudios anteriores realizados en perros con dueño (hasta del 35%) [30].

Los aspectos ecológicos de las poblaciones de mosquito flebótomos durante los dos años fueron similares a los observados en estudios anteriores realizados en el mismo lugar [19,27], siendo *P. perniciosus* y *P. neglectus* las especies más representadas. El número relativamente bajo de mosquitos flebótomos recogidos durante el primer y el segundo año del estudio podría estar relacionado con los tratamientos ambientales con Bayticol (flumetrina), llevados a cabo en junio de 2011 y en agosto de 2012 para reducir las graves infestaciones por garrapatas. No obstante, la aparición constante de mosquitos es indicativa de un riesgo real de infección por *L. infantum* en perros y humanos en esa zona. El refugio para perros elegido para este estudio está ubicado aproximadamente a 200 m de la casa más cercana en Putignano. Una zona verde con vegetación mediterránea y campos de olivos y cerezos rodeaba la residencia, que estaba delimitada por paredes de piedra que representan los lugares de reposo

típicos para los mosquitos flebótomos. La aparición de las cinco especies de mosquitos flebótomos (*P. perniciosus*, *P. neglectus*, *P. papatasi* y *S. minuta*) recogidas en este estudio, confirma los resultados de estudios entomológicos previos realizados en el sur de Italia [27], e indica una elevada diversidad en las poblaciones de estos vectores artrópodos en esta zona urbana. Bajo las anteriores circunstancias, la inclusión de perros alojados en residencias en una zona hiperendémica (en lugar de perros con dueños) es de relevancia, considerando que la mayor parte de los animales positivos para *L. infantum* actúa como fuente natural de infección para los mosquitos flebótomos en este lugar específico y reduce el sesgo de carecer de control sobre las decisiones que toma cada dueño de un animal, distintas costumbres (p. ej. mantener a los perros en el exterior durante la noche), o el riesgo de tratamiento de los animales y/o el ambiente con parasiticidas externos. Los perros confinados también sufrieron la misma presión de picaduras de mosquito, lo que viene garantizado por el mismo microhábitat para el mosquito y una carga de mosquitos similar.

Como consecuencia de los múltiples factores que determinan si hay progresión a leishmaniosis tras la infección por *L. infantum* en perros individuales, así como su velocidad, (p. ej. respuesta inmune, nivel de exposición y transmisión repetida por picaduras de mosquito flebótomo), el estado "positivo" de cada perro en este estudio se estableció utilizando una combinación de resultados a partir de estudios serológicos (IFAT), parasitológicos (citología) y moleculares (PCR) llevados a cabo en distintas muestras (médula ósea, capa leucocitaria, torundas conjuntivas y piel). A excepción de un perro (perro 20), los perros positivos sin collar se detectaron por primera vez en noviembre de 2011 mediante análisis serológico ($n = 10$) y PCR de muestras de piel, indicando de este modo que todos los perros estuvieron expuestos a *L. infantum* durante la primera estación de mosquitos flebótomos. La progresión de la infección hacia enfermedad clínica se confirmó por el hecho de que todos estos perros excepto uno siguieron siendo seropositivos y positivos para PCR de médula ósea en los siguientes puntos temporales, y nueve de los 21 perros fueron también positivos mediante citología basada en la detección de amastigotes. El análisis serológico falló en la detección de infección en seis de los 21 perros positivos que fueron positivos para citología o PCR, indicando de este modo que dicha prueba serológica debe utilizarse en combinación con otros ensayos diagnósticos para evaluar el estado de infección de los perros expuestos a los mosquitos flebótomos en zonas endémicas.



Figura 1. Un perro del Grupo B mostrando signos clínicos de leishmaniosis canina.
doi:10.1371/journal.pone.0056374.g001

Este hallazgo está probablemente relacionado con el hecho de que los perros infectados por *L. infantum* (especialmente si es asintomática) pueden no sufrir seroconversión inmediatamente, ya que el periodo de incubación previo a la seroconversión puede oscilar entre 3 meses y 7 años [35]. De este modo, la seronegatividad puede conducir a un resultado falso negativo en los grupos control y de estudio cuando se considera en solitario. En este estudio, la detección de los parásitos (citología) y/o la seropositividad se asoció con signos clínicos sólo en el 27,7% de los perros infectados por *L. infantum*, confirmando de este modo los resultados de estudios previos que habían indicado que una gran parte de los perros infectados permanecen asintomáticos durante periodos prolongados [14]. Basándose en esto, los estudios previos que han utilizado únicamente técnicas serológicas para deducir la eficacia de los insecticidas para la prevención de infecciones por *L. infantum* [30,33] deben considerarse con precaución.

Notas finales

Aunque la actividad de los mosquitos flebótomos en el sur de Europa alcanza su máximo durante el verano (es decir, junio, julio y agosto), el riesgo de picaduras de los mosquitos se extiende desde finales de primavera hasta el otoño, coincidiendo con el periodo de máxima afluencia de turistas en estas zonas, maximizando por tanto el riesgo de contraer leishmaniosis canina y humana, con la posterior introducción de perros infectados en zonas no endémicas [36]. Por lo tanto, la protección de las poblaciones caninas que pueden actuar como un importante reservorio de infección por *L. infantum* es crucial (al menos) entre mayo y octubre. **Los resultados del presente estudio indican que el uso de una formulación en collar conteniendo un 10% de imidacloprid y un 4,5% de flumetrina ofrece una protección de larga duración (hasta 8 meses), fiable y sostenible contra la infección por *L. infantum* en zonas hiperendémicas.** El uso generalizado de esta medida profiláctica efectiva, junto con estrategias adicionales de control dirigidas hacia la reducción de la infección por *L. infantum* en las poblaciones de mosquitos flebótomos en las mismas zonas ayudará en última instancia a la eliminación de los riesgos para las poblaciones canina y humana. Como se ha discutido anteriormente, se precisa de forma crítica un enfoque “onehealth” para el control de la leishmaniosis [4].

Agradecimientos

Agradecemos a Sabrina Gallo y Angelo Carucci (veterinarios en el Centro Veterinario “S. Francesco”, Putignano, Bari) y a Anna Sara De Tommasi, Alessio Gianelli, Rafael A. Ramos (Universidad de Bari, Italia) por su trabajo de campo.

Contribución de los autores

Concepción y diseño de los experimentos: DO DS. Realización de los experimentos: DO FDT DDC GDP VT MSL RPL GA GC DS. Análisis de los datos: DO FDT DDC GDP VT MSL RPL GA GC DS. Contribución con los reactivos / materiales / herramientas de análisis: DO GC DS. Redacción del artículo: DO FDT DDC EB CC GC DS.

Bibliografía

1. Desjeux P (1996) Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 14: 417–423.
2. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, et al. (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5: 873–882.
3. Dujardin JC, Campino L, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, et al. (2008) Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* 14: 1013–1018.
4. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, et al. (2012) Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol* 28(12):531–538.
5. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L (2008) Canine leishmaniasis -new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24: 324–330.
6. Desjeux P (2004) Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol* 2: 692.
7. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L (2012) Phlebotomine sand flies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*; doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.
8. Dogan N, Ozbek Y, Ozensoy TS, Dinleyici Cargi E, Bor O (2005) Sero-epidemiological survey on canine visceral leishmaniasis and the distribution of sandfly vectors in the Northwestern Turkey: prevention strategies for childhood visceral leishmaniasis. *J Trop Pediatr* 52: 212–217.
9. Athanasiou LV, Kontos VI, Saridomichelakis MN, Rallis TS, Diakou A (2012) A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta Tropica* 122(3): 291–295.
10. Petersen CA, Barr SC (2009) Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 39: 1065–1074.
11. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, et al. (2008) The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health* 13: 256–264.
12. Otranto D, Capelli G, Genchi C (2009) Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniasis vs. dirofilariosis. *Parasit Vectors* 2: S2.
13. Dantas-Torres F, Felino de Brito EM, Pinto Brandao-Filho S (2006) Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol* 310: 54–60.
14. Otranto D, Paradies P, de Caprariis D, Stanneck D, Testini G, et al. (2009) Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clin Vaccine Immunol* 16: 337–343.
15. Nery-Guimaraes F, Bustamante FM (1954) Aplicação domiciliar de DDT como base da profilaxia das leishmanioses – Estudo de um foco de leishmaniose mucocutânea cinco anos depois da aspersão periódica com aquele inseticida. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* 6: 127–130.
16. Lainson R, Rangel EF (2005) *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 811–827.
17. Alexander B, Maroli M (2003) Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 17: 1–18.
18. Rogan W, Chen A (2005) Health risks and benefits of bis (4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *Lancet* 366: 763–773.
19. Otranto D, de Caprariis D, Lia RP, Tarallo V, Lorusso V, et al. (2010) Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Vet Parasitol* 172: 323–332.
20. Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, et al. (2004) Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol* 34: 55–62.
21. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP (1997) Protection of dogs from the bites of phlebotomine sandflies by delta-methrin collars for the control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 11: 105–111.

22. Maroli M, Mizzon V, Siragusa C, D'Orazi A, Gradoni L (2001) Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in Southern Italy. *Med Vet Entomol* 2001;15:358–63.
23. Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, et al. (2007) Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet Parasitol* 144: 270–278.
24. Otranto D, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa MS, Diniz PP, et al. (2010) Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. *J Clin Microbiol* 48: 3316–3324.
25. Stanneck D, Ebbinghaus-Kintscher U, Schoenhense E, Kruehwagen EM, Turberg A, et al. (2012) The synergistic action of imidacloprid and flumethrin and their release kinetics from collars applied for ectoparasite control in dogs and cats. *Parasit Vectors* 5: 73.
26. Stanneck D, Rass J, Radeloff I, Kruehwagen E, Le Sueur C, et al. (2012) Evaluation of the long-term efficacy and safety of an imidacloprid 10%/ flumethrin 4.5% polymer matrix collar (SerestoH) in dogs and cats naturally infested with fleas and/or ticks in multicentre clinical field studies in Europe. *Parasit Vectors* 5: 66.
27. Tarallo VD, Dantas-Torres F, Lia RP, Otranto D (2010) Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. *Acta Trop* 116: 227–234.
28. Maroli M, Bigliocchi F, Khoury C (1994) Sandflies in Italy: observations on their distribution and methods of control. *Parassitologia* 36: 251–264. [in Italian]
29. Moreira Jr ED, Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes de Carvalho L (2004) Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol* 6: 245–252.
30. Foglia Manzillo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, et al. (2006) Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet Parasitol* 142: 142–145.
31. Paradies P, Capelli G, Cafarchia C, de Caprariis D, Sasanelli MT, et al. (2006) Incidence of canine leishmaniasis in an endemic area of Southern Italy. *J Vet Med B* 53: 295–298.
32. Vlkova M, Rohousova I, Drahota J, Stanneck D, Kruehwagen, et al. (2011) Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 5(10):e1344.
33. Maroli M, Mizzon V, Siragusa C, D'Orazi A, Gradoni L (2001) Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol* 15: 358–363.
34. Oliva G, Scalone A, Foglia-Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, et al. (2006) Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol* 44: 1318– 1322.
35. Talmi-Frank D, Strauss-Ayal D, Jaffe C, Baneth G (2006) Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 13: 271–276.
36. Menn B, Lorentz S, Naucke TJ (2010) Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasite Vectors* 3: 34.



Seresto collar 1,25 g + 0,56 g para gatos. Seresto collar 1,25 g + 0,56 g para perros ≤ 8 kg. Seresto collar 4,50 g + 2,03 g para perros > 8 kg. Composición: 1 Collar (38 cm) de Seresto para gatos y Seresto para perros ≤ 8 kg contiene: 1,25 g de imidacloprid y 0,56 g de flumetrina. 1 Collar (70 cm) de Seresto para perros > 8 kg contiene: 4,50 g de imidacloprid y 2,03 g de flumetrina. **Indicaciones:** Perros Prevención (*Ctenocephalides felis*, *C. canis*) y tratamiento (*C. felis*) de la infestación por pulgas durante 7-8 meses. Gatos: Prevención y tratamiento de la infestación por pulgas (*C. felis*) durante 7-8 meses. En perros, protege el entorno inmediato del animal al inhibir el desarrollo de larvas de pulga durante 8 meses y en gatos, durante 10 semanas. Puede utilizarse como parte de una estrategia de tratamiento de la dermatitis alérgica por picadura de pulgas (DAPP). El medicamento es eficaz contra las infestaciones por garrapatas durante 8 meses por su efecto repelente (en perros, *Ixodes ricinus* y *Rhipicephalus sanguineus* y en gatos, *Ixodes ricinus*) y su efecto acaricida (en perros *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor reticulatus* y en gatos, *Ixodes ricinus* y *Rhipicephalus turanicus*). Es eficaz contra larvas, ninfas y garrapatas adultas. Las garrapatas presentes en el animal antes del tratamiento pueden no morir en las primeras 48 horas después de la aplicación del collar, por lo que podrían permanecer adheridas y visibles. Por tanto, se recomienda retirar las garrapatas existentes en el animal previo a la aplicación del collar. La prevención de nuevas infestaciones por garrapatas se inicia durante los dos primeros días después de la aplicación del collar. En perros, el collar protege de modo indirecto frente a la transmisión de los patógenos *Babesia canis vogeli* y *Ehrlichia canis* por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* y en consecuencia, se disminuye el riesgo de babesiosis canina y ehrlichiosis canina durante 7 meses. En perros, además está indicado para el tratamiento de la infestación por piojos picadores/masticadores (*Trichodectes canis*). Preferentemente, el collar debe aplicarse antes del inicio de la temporada de pulgas o garrapatas. **Contraindicaciones:** No tratar a cachorros de menos de 7 semanas ni a gatitos de menos de 10 semanas. No usar en caso de hipersensibilidad a las sustancias activas o a algún excipiente. **Precauciones de uso:** Para los animales: El medicamento es resistente al agua y continúa siendo eficaz aunque el animal se moje. Sin embargo, debe evitarse una exposición intensa y prolongada al agua o el uso frecuente de champú dado que la duración de la actividad puede verse disminuida. Para la persona que administra el medicamento: Mantenga la bolsa que contiene el collar en la caja hasta el momento de su uso. No permita que los niños jueguen con el collar ni que se lo introduzcan en la boca. Los animales que lleven collar no deberían dormir en la cama con sus propietarios, especialmente los niños. Las personas con hipersensibilidad conocida a los componentes del collar deben evitar el contacto con el collar. Lávese las manos con agua fría después de colocar el collar. **Reacciones adversas:** Ocasionalmente, en los primeros días tras la colocación del collar en animales que no están acostumbrados a llevar collar, pueden observarse cambios leves en el comportamiento incluyendo rascado en la zona de aplicación. Asegúrese de que no esté demasiado apretado. En raras ocasiones en perros e infrecuentemente en gatos, pueden producirse reacciones leves en la zona de aplicación tales como prurito, eritema y pérdida de pelo, que generalmente desaparecen en 1 o 2 semanas sin necesidad de retirar el collar. En casos aislados, puede ser recomendable la retirada temporal del collar hasta que los síntomas hayan desaparecido. Además en gatos, en raras ocasiones, pueden aparecer al principio reacciones leves y pasajeras tales como depresión, cambios en la ingesta, salivación, vómitos y diarrea. En muy raras ocasiones en perros y en raras ocasiones en gatos, pueden producirse reacciones en la zona de aplicación tales como dermatitis, inflamación, eczema o lesiones. En estos casos se recomienda retirar el collar. Al igual que ocurre con otros medicamentos de uso tópico, pueden presentarse dermatitis alérgicas de contacto en animales con hipersensibilidad. **Uso durante la gestación o lactancia:** En ausencia de datos disponibles, el medicamento no se recomienda en perras ni gatas en gestación o lactación. **Posología y modo de administración:** 1 collar por animal. Ajuste el collar sin apretar alrededor del cuello (dejar un espacio de aproximadamente 2 dedos entre el collar y el cuello). El animal debe llevar el collar de forma continua durante los 8 meses de periodo de protección. Compruebe el collar periódicamente y ajústelo si fuera necesario, especialmente en cachorros y gatitos con crecimiento rápido. El collar está diseñado con un mecanismo de cierre seguro. En el caso improbable de que un gato quedara atrapado por el collar, la misma fuerza del animal es suficiente para ensancharlo y quitárselo rápidamente. **Sobredosificación:** Es improbable que ocurra una sobredosis y no se esperan signos de sobredosis. En el caso improbable de que el animal ingiera un collar, podrían presentarse síntomas gastrointestinales leves. **Propiedades farmacológicas:** Imidacloprid es un ectoparasiticida activo contra los estadios larvales de las pulgas, las pulgas adultas y los piojos. La actividad contra la pulga *C. felis* comienza inmediatamente tras la aplicación del collar. En perros, la eficacia apropiada contra *C. canis* empieza tras una semana de aplicado el collar. Flumetrina es un ectoparasiticida que proporciona la actividad acaricida del medicamento, por lo que previene la formación de huevos fértiles por su efecto letal sobre las garrapatas hembras. Por otro lado, en un estudio in vitro con garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* expuestas a una dosis subletal de 4 mg de flumetrina/L se observó que entre un 5 y un 10 % de las garrapatas pusieron huevos con el aspecto alterado (arrugados, sin brillo y secos), lo que indica además el efecto esterilizante de flumetrina. El medicamento tiene un efecto repelente contra garrapatas. En perros, los resultados de dos estudios clínicos de campo efectuados en zonas endémicas de *Leishmania infantum* muestran una disminución significativa del riesgo de transmisión de *Leishmania* por flebotomos en perros tratados respecto a los no tratados, independientemente de que la eficacia en la prevención de la picadura no haya sido documentada. La influencia del uso del champú o inmersión en agua respecto a la transmisión de la leishmaniosis canina no fue estudiada. Los collares mejoran la infestación por *Sarcoptes scabiei* en perros preinfestados y se logra la curación completa después de 3 meses. Las dos sustancias activas se liberan continua y lentamente a bajas concentraciones, del collar hacia el animal, estando presentes en el pelaje a concentraciones acaricidas/insecticidas durante el periodo de eficacia completo. **Precauciones para la eliminación del medicamento:** Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad con las normativas locales. Este medicamento no se deberá verter en cursos de agua puesto que podría resultar peligroso para los peces y otros organismos acuáticos. **Formatos comercializados:** Seresto collar 1,25 g + 0,56 g para gatos: Caja con 1 collar. Seresto collar 1,25 g + 0,56 g para perros ≤ 8 kg: Caja con 1 collar. Seresto collar 4,50 g + 2,03 g para perros > 8 kg: Caja con 1 collar. **Titular de la Autorización:** Bayer Hispania, S.L., Av. Baix Llobregat, 3-5. 08970 Sant Joan Despí (Barcelona). **Número de registro:** 2348 ESP, 2349 ESP y 2351 ESP. Sin prescripción veterinaria. Para más información consulte la ficha técnica en bayervet.net



seresto®

- La combinación al 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina demostró ser adecuada y 100% eficaz en la prevención de la infección por *L. infantum* en perros jóvenes tras su primera exposición al agente etiológico de leishmaniosis canina en un área hiperendémica.
- La prolongada eficacia de esta combinación está muy probablemente asociada al hecho de que la matriz del collar permite una liberación uniforme de los principios activos a una concentración constante [16,25,26], a diferencia de los collares con deltametrina [20,21,30].
- Ninguno de los perros con collar sufrió seroconversión, pasó a ser positivo en la PCR o mostró signos clínicos indicativos de leishmaniosis canina, lo que puede atribuirse a la actividad anti-alimentación de flumetrina.
- Los resultados del presente estudio indican que el uso de una formulación en collar conteniendo un 10% de imidacloprid y un 4,5% de flumetrina ofrece una protección de larga duración (hasta 8 meses), fiable y sostenible contra la infección por *L. infantum* en zonas hiperendémicas.



seresto®

Seresto® reduce el riesgo de transmisión de la leishmaniosis y otras enfermedades de transmisión vectorial.



Bayer HealthCare

Avda. Baix Llobregat 3-5
08970 Sant Joan Despí (Barcelona)

seresto.es

