

INVESTIGACIÓN

Acceso libre

Prevención de la leishmaniosis felina mediante un collar de matriz de polímero con un 10 % de imidacloprid y un 4,5 % de flumetrina

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

Resumen

Antecedentes: La leishmaniosis, causada por *Leishmania infantum*, es una de las enfermedades transmitidas por los vectores más importantes que afectan a los animales y las personas en todo el mundo. Los perros se consideran los principales reservorios de las formas zoonóticas, aunque en los últimos años el papel de los gatos como reservorios se ha investigado cada vez más. La leishmaniosis felina (LF) se produce en zonas endémicas y, hasta el momento, no se han estudiado medidas preventivas específicas. Hemos evaluado la eficacia frente a la LF un collar de matriz de polímero con un 10 % de imidacloprid y un 4,5 % de flumetrina, autorizado para la prevención de las infestaciones por pulgas y garrapatas, en un estudio longitudinal con 204 gatos con dueño en las islas Eolias (Sicilia), una zona muy endémica de esta enfermedad. Entre marzo y mayo de 2015 (día del estudio [DE] 0), a gatos negativos para LF se les colocó un collar (G1, n = 104) o se dejaron sin tratar (G2, n = 100). El diagnóstico se realizó mediante pruebas serológicas y qPCR en sangre e hisopos conjuntivales, que se recogieron al inicio del estudio (DE 0) y al final del mismo (DE 360). Se realizaron exploraciones clínicas intermedias el DE 210 (cuando se reemplazaron los collares en el G1) y el DE 270.

Resultados: De los 159 gatos que finalizaron el estudio, 5 en el G1 y 20 en el G2 fueron positivos para infección por *L. infantum* en al menos una de las pruebas diagnósticas, arrojando una incidencia anual bruta del 6,3 % y del 25,0 % en el G1 y el G2, respectivamente (P = 0,0026). Esto se traduce en una eficacia del collar del 75,0 % para prevenir la infección felina por *Leishmania*. El collar fue generalmente bien tolerado, sin reacciones adversas sistémicas; se observaron reacciones cutáneas locales en la zona de aplicación en solo 4 de los 104 gatos tratados (3,8 %).

Conclusiones: El collar de matriz de polímero con un 10 % de imidacloprid y un 4,5 % de flumetrina reduce significativamente el riesgo de infección por *L. infantum* en gatos. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en el que se evalúa una estrategia preventiva contra la infección felina por *Leishmania* en condiciones naturales. Nuestros resultados cubren un vacío en la medicina veterinaria al confirmar que este collar es una herramienta para reducir el riesgo de infección por *Leishmania* en gatos. Tal herramienta preventiva podría contribuir a la reducción del riesgo de la enfermedad en animales y en poblaciones humanas cuando se incluye en programas integrados de control de la leishmaniosis.

Palabras clave: *Leishmania infantum*, Gato, Leishmaniosis felina, Prevención, Piretroides, Flumetrina.

* Correspondencia: ebrianti@unime.it

†Colaboradores en igualdad de condiciones.

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina, Messina (Italia).

Al final del artículo se incluye la información completa sobre los autores.

Antecedentes

La leishmaniosis, causada por *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) es una enfermedad parasitaria transmitida por vectores que afecta a personas y animales en todo el mundo. La enfermedad en los seres humanos se incluye entre las enfermedades tropicales desatendidas más importantes, con hasta 0,4 y 1,2 millones de casos al año para las formas visceral y cutánea, respectivamente [1], y ha sido la única enfermedad tropical transmitida por vectores endémica del sur de Europa durante décadas [2]. Aunque se considera que los perros son los reservorios principales de *L. infantum* en muchas zonas endémicas, otras especies de animales domésticos y salvajes han estado implicadas en la epidemiología de la infección como reservorios secundarios [3, 4]. Hasta el primer informe de leishmaniosis felina (LF) [5], se pensaba que el gato era una especie resistente y su participación considerada insignificante para la epidemiología de la infección [6]. El principal motivo de esta suposición era el bajo número de casos clínicos en gatos, especialmente si se compara con el de perros que viven en las mismas zonas endémicas. [7–12]. En los últimos años, el desarrollo de la medicina felina, junto con el uso de protocolos serológicos y moleculares más específicos para diagnosticar la infección en gatos han proporcionado pistas para una mejor comprensión de la LF [13, 14]. Por consiguiente, se han notificado cada vez más casos de LF en zonas endémicas de leishmaniosis canina, con tasas de prevalencia de hasta el 68,5 % en función de la población de gatos estudiada y los métodos de diagnóstico [14]. Además, a pesar de que número de casos clínicos siempre se ha considerado marginal, los informes de afecciones clínicas debidas a LF están aumentando en gatos que sufren infecciones inmunodebilitantes concurrentes, como las causadas por el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y el virus de la leucemia felina (VLF), o enfermedades neoplásicas, así como en animales sin pruebas de coinfecciones [14]. Cabe señalar que los signos de la LF se superponen parcialmente a los observados en perros enfermos con lesiones cutáneas, y el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos es el notificado con más frecuencia [14–16]. Los flebótomos, vectores naturales de *L. infantum*, son hematófagos oportunistas y pueden alimentarse de la sangre de muy diversos animales, tanto salvajes como domésticos, incluidos los gatos [17]. La infectividad de los gatos infectados por *L. infantum* ha quedado demostrada en estudios de xenodiagnóstico para *Phlebotomus perniciosus* [18] y *Lutzomyia longipalpis* [19], dos vectores competentes. Estos datos finalmente han proporcionado más pruebas sobre el posible papel de los gatos como reservorio de *L. infantum*. Un reciente estudio sobre enfermedades transmitidas por vectores (ETV) con gatos y perros de las islas Eolias (Sicilia, sur de Italia), una zona endémica para *L. infantum*, encontró prevalencias del 26 % y el 42 % en gatos y perros, respectivamente, utilizando métodos serológicos y moleculares [20]. Además, se detectó una incidencia anual de infección por *L. infantum* de hasta

el 15 % en gatos expuestos a una transmisión estacional, lo cual indica que, al igual que los perros, los gatos que viven en zonas endémicas están expuestos a la infección [20]. Ahora se reconoce a los gatos como un posible reservorio doméstico de *L. infantum*, y se ha abogado por la implantación de estrategias para prevenir la infección en esta especie animal [14, 16].

La estrategia más prometedora en estos momentos para prevenir la infección por *Leishmania* en perros es el uso de piretroides sintéticos en diferentes formulaciones (por ejemplo, pipeta, collar y pulverización) con propiedades repelentes contra los flebótomos [4]. Sin embargo, la mayoría de los piretroides, a excepción de la flumetrina, son tóxicos para los gatos [21], lo que obstaculiza así los estudios sobre prevención de la infección por *Leishmania* en esta especie animal [14, 16]. Recientemente, se ha registrado para uso en gatos un collar de matriz de polímero que contiene una combinación del 10 % de imidacloprid y el 4,5 % de flumetrina (collar Seresto®, Bayer Animal Health, Monheim Alemania), en adelante «collar», para la prevención de las infestaciones por pulgas y garrapatas, con acción repelente (antialimentación) [22]. El mismo collar está disponible también para el control (hasta 8 meses) de las pulgas y garrapatas en perros [23]; aunque no se registró con mención expresa de actividad contra los flebótomos, el collar demostró ser altamente eficaz (es decir, eficacia del 88,3 % al 100 %) para reducir el riesgo de infección por *L. infantum* en perros que viven en zonas endémicas [24–26].

En el presente estudio, evaluamos la eficacia del collar en la prevención de la infección felina por *Leishmania*, en una cohorte de gatos con dueño que viven en el archipiélago Eolio, donde la LF causada por *L. infantum* es muy endémica.

Métodos

Animales y localización del estudio

El estudio se llevó a cabo entre marzo de 2015 y abril de 2016 en Lipari y Vulcano, dos de las principales islas del archipiélago Eolio (mar Tirreno, Sicilia, Italia, 38,4724°N, 14,9541°E), una zona geográfica reconocida como endémica para ETV caninas y felinas y en la que se registró una prevalencia global del 26 % y una incidencia del 15 % de infección por *L. infantum* en gatos [20]. Los animales se incluyeron en el estudio entre marzo y mayo de 2015, antes del comienzo de la temporada de los flebótomos, y no abandonaron la zona del estudio ni viajaron a otros lugares. Los gatos incluidos en el estudio tenían al menos 10 semanas de vida y unas condiciones de salud general satisfactorias, vivían al aire libre o tenían acceso constante al mismo y eran negativos para infección por *L. infantum*, demostrado mediante serología, PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y citología (véase a continuación).

Diseño del estudio

El estudio cumplió las buenas prácticas clínicas (BPC) conforme a la directriz 9 de la VICH (<http://www.vichsec>).

org); se trató de un estudio de campo, aleatorizado, con enmascaramiento parcial y control negativo, que se realizó en gatos con dueño. El protocolo del estudio fue aprobado por el Ministerio de Sanidad italiano y los animales se incluyeron solamente tras la firma de un consentimiento informado por parte de sus dueños. En la visita de inclusión (día del estudio [DE] 0), los gatos fueron identificados, se les sometió a una exploración física y se les asignó a uno de los grupos del estudio (G1 = collar Seresto® para gatos; G2 = controles no tratados) conforme a un plan de asignación aleatoria «por hogar» para evitar contactos entre los gatos que llevaban el collar y los que no lo llevaban. Se tomaron muestras de sangre e hisopados conjuntivales de los animales y, a los asignados al G1, se les aplicó el collar de acuerdo con el prospecto. Para resumir, el collar se colocó en el cuello del gato y se ajustó de acuerdo con las instrucciones de la ficha técnica, de manera que quedara cómodo (se debían poder insertar dos dedos entre el cuello del animal y el collar una vez colocado este). Los animales asignados al G2 se dejaron sin tratar y sirvieron como controles negativos.

Todos los gatos incluidos se sometieron a una exploración clínica y se pesaron los DE 210, 270 y 360 (figura 1). Además, el DE 360 (cierre del estudio) se tomaron de nuevo muestras de sangre e hisopados conjuntivales de los gatos. Los collares de los gatos del G1 se sustituyeron el DE 210 (y en cualquier otro momento si el collar sufría daños o se perdía). Durante el estudio, los gatos permanecieron con sus propietarios y recibieron los cuidados habituales, sin imponerles ningún tipo de restricción o medida de contención fuera de lo normal. Se pidió a los propietarios de los gatos del grupo G1 que observaran a sus animales diariamente e informaran, tan pronto como lo detectaran, de cualquier anomalía en la salud general de los animales, así como de pérdidas o daños en el collar. No se permitió a lo largo del estudio ningún tratamiento con efectos conocidos contra vectores de *L. infantum* o ectoparásitos. En el G2, en caso de infestación intensa por pulgas, se permitió un tratamiento de rescate con Advantage® para gatos (imidacloprid, Bayer Animal Health GmbH, Monheim, Alemania) para el bienestar de los animales.

Recogida de muestras y procedimientos analíticos

Se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular de unos 5 ml, de los cuales se repartieron 2 ml en dos tubos con anticoagulante (K3 EDTA). Del primer tubo, se llenaron dos tubos capilares y se centrifugaron para la extracción de la capa leucocitaria y la preparación de frotis en portaobjetos de vidrio. El resto de la sangre se procesó para determinar el hemograma completo con un dispositivo automático de recuento de células sanguíneas (ProCyte Dx®, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, EE. UU.). La sangre del segundo tubo EDTA se procesó y analizó para el diagnóstico molecular de *L. infantum*. Se depositaron 3 ml de sangre en un tubo con coagulante, a partir del cual se obtuvo por centrifugación (1800 g durante 10 min) el suero, se guardó congelado (-20 °C) hasta el análisis. Se recogieron hisopados conjuntivales para el diagnóstico de infección por *L. infantum*, con hisopos de algodón estériles fabricados para aislamiento bacteriológico. Se tomó una muestra de cada ojo pasando el hisopo por la superficie del párpado inferior para recoger las células exfoliadas. Los hisopados conjuntivales se introdujeron en tubos estériles y se congelaron (-20 °C) hasta el análisis. Las muestras de suero recogidas el DE 0 y el DE 360 se analizaron para detección de anticuerpos contra *L. infantum* mediante una prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT), como se describe en otro documento [27]. El ensayo IFAT se preparó utilizando conjugados específicos para gatos (anticat IgG; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y en cada placa se incluyó un control positivo, obtenido de suero de un gato infectado por *L. infantum*. Las muestras se calificaron como positivas cuando produjeron una clara fluorescencia citoplasmática y de membrana de los promastigotes, a una dilución de corte de 1:80 para los sueros del DE 360 (cierre del estudio), aunque los animales con dilución 1:40 de los sueros recogidos en el DE 0 (inclusión) fueron excluidos del estudio. Los sueros positivos se titularon mediante diluciones seriadas hasta la negatividad. Las muestras de sangre y los hisopados conjuntivales recogidos el DE 0 y el DE 360 se sometieron a análisis molecular para *L. infantum* mediante qPCR. Resumiendo, se extrajo ADN genómico de la sangre y los hisopados conjuntivales mediante el QIAamp

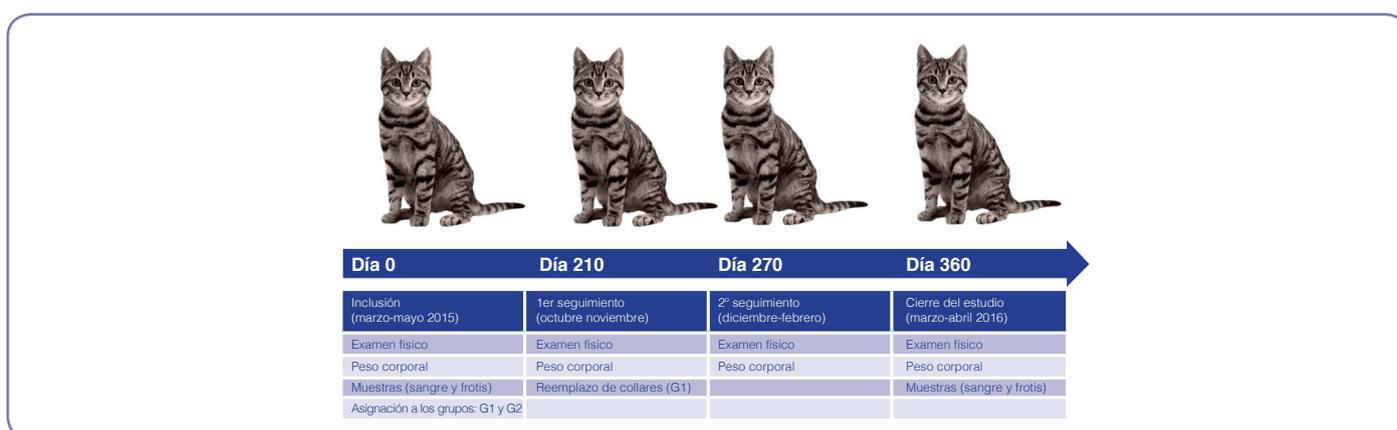


Figura 1 Puntos temporales del estudio y actividades programadas

DNA Micro Kit (Qiagen, Milán, Italia), conforme a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, un fragmento (120 pb) del ADN minicircular del cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum* se amplificó mediante qPCR mediante un protocolo descrito en otro documento [28]. Para todas las pruebas de PCR, se incluyeron controles positivos (ADN de muestras de sangre positivas para el patógeno) y negativos (sin ADN).

Se prepararon frotis de la capa leucocitaria, tal como se describió más arriba, y se tiñeron con la tinción rápida de May-Grünwald-Giemsa (Bio-Optica, Milán, Italia). Se buscaron inclusiones intracelulares o formas libres (amastigotes) de *L. infantum* en cada frotis, examinando toda la superficie teñida a bajo aumento ($\times 100$) y las zonas representativas a gran aumento ($\times 1000$) durante 10 min. Todas las muestras y frotis se identificaron mediante un código alfanumérico exclusivo, y el personal de laboratorio que realizó los análisis no conocía a qué grupo de tratamiento pertenecían las muestras.

Estudio entomológico

Se usaron trampas de luz y adhesivas para controlar la presencia y la actividad de los flebótomos durante el periodo del estudio. Entre mayo y diciembre de 2015, se colocaron mensualmente trampas en ocho puntos distintos (cinco en Lipari y tres en Vulcano). Se colocaron trampas cerca de algunos de los hogares cuyos gatos se incluyeron en el estudio (figura 2). En cada punto y para cada sesión de captura se colocaron una trampa de luz y trampas adhesivas sobre un total de 2 m² y se dejaron actuar durante 2 días consecutivos (trampas adhesivas) o 2 noches consecutivas, es decir, de 6:00 p.m. a 7:00 a.m. (trampas de luz). La actividad de captura se interrumpió en cada punto después de dos sesiones consecutivas sin capturas. Los flebótomos capturados se separaron de los demás insectos con ayuda de un estereomicroscopio, se diferenciaron por sexo y se guardaron en viales que contenían etanol al 70 %, etiquetados con el punto y la fecha de captura. Se prepararon todos los especímenes de flebótomos para su observación microscópica como se describe en otro documento [29] y se determinó su especie con ayuda de guías taxonómicas [30].



Figura 2 Trampa para flebótomos en un recinto doméstico de la isla de Lipari. En cada uno de los ocho puntos se colocaron cada mes una trampa de luz (flecha LT) y trampas adhesivas (flecha ST) y se dejaron actuar durante dos días consecutivos

Gestión de datos y análisis estadístico

Se calculó un tamaño de muestra mínimo de 80 gatos para cada grupo, basado en los siguientes supuestos: nivel de confianza, 95 %; potencia, 80 %; incidencia esperada de infección por *L. infantum*, 2 % y 12 % en gatos tratados y gatos no tratados, respectivamente. En previsión de un abandono de alrededor del 20 % durante el período de estudio, se incluyó un mínimo de 100 gatos en cada grupo. Se consideró que un gato estaba infectado por *L. infantum* si daba resultado positivo en al menos una de las pruebas de diagnóstico utilizadas (IFAT, qPCR en sangre y en hisopados conjuntivales, o citología de la capa leucocitaria). La eficacia para prevenir la infección por *L. infantum* se basó en la incidencia bruta anual (IBA), el porcentaje de gatos infectados en cada grupo el DE 360, y se calculó en cada grupo de la siguiente manera: $IBA = \frac{\text{número de animales infectados}}{\text{número de animales negativos incluidos} - \text{número de animales que no completaron el estudio}} \times 100$.

Se analizó la significación estadística de la diferencia entre la IBA del G1 y la del G2 mediante la prueba de la ji al cuadrado (χ^2). La eficacia para prevenir la infección por *Leishmania* se calculó mediante la siguiente fórmula: $Eficacia = \frac{A-B}{A} \times 100$; donde A es el % de animales infectados en el grupo de control y B es el % de animales en el grupo de tratamiento.

Los análisis estadísticos y la aleatorización se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS® 13.0, nQuery + nTerim 3.0 (StatSols), Statistical Solutions® Ltd. 2014 y Microsoft® Excel 2010.

Resultados

En el estudio se incluyeron en total 204 gatos (104 en el G1 y 100 en el G2), pertenecientes a 80 propietarios, el DE 0. La población del estudio estaba compuesta por 111 hembras (54,4 %) y 93 machos (45,6 %) con edades comprendidas entre 6 meses y 15 años. Durante el estudio, 45 gatos (25 del G1 y 20 del G2) fueron retirados o se perdieron para el seguimiento por diferentes motivos (p. ej., el animal desapareció y no volvió a aparecer en los 2 días siguientes, o bien se produjo algún acontecimiento adverso o se sospechó una reacción adversa), mientras que completaron el estudio 159 gatos (79 del G1 y 80 del G2) (tabla 1). Entre los gatos excluidos, 18 (8 del G1 y 10 del G2) fueron retirados después de la inclusión porque se vio que estaban infectados por *L. infantum* al analizar las muestras recogidas el DE 0. En las muestras recogidas al cierre del estudio (DE 360), 5 de los 79 gatos del G1 y 20 de los 80 gatos del G2 fueron positivos para infección por *L. infantum* en al menos una de las pruebas de diagnóstico (tabla 2). La mayoría de los gatos con resultados positivos lo fueron para la IFAT (15/25; 60 %), mientras que solo algunos lo fueron para la qPCR en sangre (5/25; 20 %), hisopado conjuntival (1/25; 4 %) o ambas muestras (4/25; 16 %).

Tabla 1 Número y características de los gatos tratados con el collar Seresto® (G1) y de los controles no tratados (G2) que completaron el estudio o fueron excluidos del mismo.

	G1	G2	Total
Completaron el estudio			
Número de gatos	79	80	159
Número de hogares	41	39	80
Edad media en meses (mín. - máx.)	38,3 (6-180)	29,3 (7-144)	33,7 (6-180)
Sexo (%) hembras/machos	53,2/46,8	55,0/45,0	54,1/45,9
Peso medio en kg (mín. - máx.)	4, (1,9-7,8)	3,9 (2,1-7,0)	4,09 (1,9-7,8)
Longitud del pelo (%) corto/largo	81,0/19,0	78,8/21,2	79,9/20,1
Medio (%) rural/suburbano/urbano	48,1/48,1	56,2/38,8	52,2/43,4
	3,8	5,0	4,4
Retirados del estudio			
	G1	G2	Total
Número de gatos	25	20	45
Muertos ^a	6	3	9
Sospecha de reacción adversa	1	-	1
Infectados por <i>L. infantum</i> en la inclusión	8	10	18
Perdidos para el seguimiento	8	7	15
Pérdida del collar y no reemplazado con prontitud	2	-	2

^aAtropellados (n = 4), probable enfermedad infecciosa (n = 3), insuficiencia respiratoria (n = 1), tromboembolia aórtica (n = 1)

Solo 3 gatos de los 25 (12 %) que resultaron positivos en la IFAT lo fueron también en la qPCR en sangre y/o hisopado conjuntival. Ninguno de los gatos dio positivo en los frotis para citología de la capa leucocitaria, ya fuera en la inclusión (DE 0) o al cierre del estudio (DE 360). La IBA fue del 6,3 % en el G1 y del 25,0 % en el G2 ($\chi^2 = 9,095$, $df = 1$, $P = 0,0026$) lo que arroja una eficacia del collar del 75 % para prevenir la LF. Al cierre del estudio, todos los gatos se encontraban en buen estado de salud en general; sin embargo, algunos de ellos mostraban signos sistémicos, como agrandamiento de los ganglios linfáticos periféricos (G1 = 15,2 %; G2 = 35,0 %) y esplenomegalia (G1 = 5,1 %; G2 = 21,3 %). Los signos.

Tabla 2 Resultados serológicos (IFAT) y de la qPCR en sangre e hisopado conjuntival para *Leishmania infantum* en los gatos tratados con el collar Seresto® (G1) o en los controles no tratados (G2) tras exponerse a una estación de transmisión del patógeno en una zona muy endémica

Grupo	n	Título IFAT		qPCR		Total (%) ^a
		1:80	1:160	Sangre	H.C.	
G1	79	2	1	2	1	5 (6,3)A
G2	80	9	3	10	5	20 (25,0)

B

^aNo la suma por grupo y fila como animales individuales que dieron positivo en varias pruebas, sino el número total de individuos que dieron positivo en un grupo. Las diferencias significativas están marcadas con letras mayúsculas diferentes. ($\chi^2 = 9,095$, $df = 1$, $P = 0,0026$) Abreviatura: H.C., hisopado conjuntival

clínicos fueron más frecuentes en los animales del G2 que en los de G1 ($\chi^2 = 7,266$, $df = 1$, $P = 0,0070$).

Durante el estudio, 18 gatos perdieron el collar una vez y 1 gato lo perdió dos veces; los collares se reemplazaron en el transcurso de los 2 días siguientes, excepto en dos casos en los que el propietario no comunicó la pérdida, por lo que los animales se excluyeron del estudio (tabla 1). El collar fue bien tolerado y se observaron reacciones cutáneas locales en la zona de aplicación en solo 4 de los 104 gatos tratados (3,8 %). De estos, 1 mostró alopecia leve, 2 dermatitis y prurito leves y 1, dermatitis ulcerosa. Excepto en el último caso, en el cual se retiró el collar y el animal se excluyó del estudio y recibió tratamiento tópico para el trastorno (a saber, antibióticos y antiinflamatorios), todos los demás se recuperaron en pocos días sin necesidad de retirar el collar. Se registraron infestaciones intensas por pulgas con la consiguiente dermatitis pruriginosa en 16 gatos del G2; en estos casos estaba autorizado un tratamiento de rescate con un producto comercial en pipeta a base de imidacloprid (Advantage® para gatos, Bayer Animal Health GmbH, Monheim, Alemania) para el bienestar de los animales.

Se capturaron en total 329 flebótomos de tres especies, concretamente *P. perniciosus* (n = 296; 90,0 %), *Phlebotomus neglectus* (n = 16; 4,8 %) y *Sergentomyia minuta* (n = 17; 5,2 %), desde finales de mayo hasta octubre de 2015. La mayor parte de los flebótomos se capturaron con las trampas de luz (n = 297; 90,3 %) (tabla 3).

Discusión

El collar Seresto® con una combinación del 10 % de imidacloprid y el 4,5 % de flumetrina demostró ser eficaz para reducir el riesgo de infección por *L. infantum* en gatos, por lo que es una herramienta para el control de la LF en zonas endémicas. La IBA registrada en el G2, del 25 %, fue mayor que la que se había notificado anteriormente en gatos (15 %) en las mismas zonas [20], aunque similar a la de los perros (es decir, del 27 %). Los gatos incluidos en este ensayo tenían un alto riesgo de infección por *L. infantum* cuando se realizó el estudio en esta zona altamente endémica para LF. La gran mayoría de los gatos vivían constantemente al aire libre en áreas suburbanas o rurales; además, los animales del grupo de control no fueron tratados con ningún insecticida, excepto en los casos en que recibieron tratamiento de rescate debido a una infestación intensa por pulgas. Aunque los gatos parecen más resistentes que los perros a *L. infantum* [6], nuestros datos indican que, al menos la posibilidad de infección, es similar en ambos hospedadores, ya que se basa en el riesgo de exposición a las picaduras de flebótomos, y teniendo en cuenta también que algunos vectores muestran un comportamiento alimentario caótico [17].

El diagnóstico de infección por *Leishmania* en gatos es problemático [14]. La mayoría de los gatos infectados fueron positivos en la IFAT, pero hay que señalar que 10 de los 25 animales infectados fueron positivos solo en la prueba de

Tabla 3 Puntos y meses de captura de *Phlebotomus perniciosus* en la zona del estudio. En cada punto se utilizó una trampa de luz y trampas adhesivas con un total de 2 m²

Punto	Entorno	Mes de captura					
Lipari 1	Urbano		Junio	Julio			
Lipari 2	Rural	Mayo		Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Lipari 3	Suburbano			Julio	Agosto	Septiembre	
Lipari 4	Urbano		Junio				
Lipari 5	Urbano					Septiembre	
Vulcano 1	Rural	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Vulcano 2	Rural	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Vulcano 3	Suburbano				Agosto	Septiembre	

qPCR, y esta con más frecuencia en sangre (9/10) que en hisopado conjuntival (5/10) ($\chi^2 = 2,143$, $df = 1$, $P = 0,1432$). Aunque la comparación de los resultados entre diferentes estudios no siempre es posible, nuestros resultados concuerdan en general con los notificados en estudios anteriores que combinaron pruebas serológicas y moleculares para investigar la prevalencia de la infección por *L. infantum* en gatos [20, 31, 32].

Por otra parte, el hisopado conjuntival se considera actualmente una técnica sensible, no invasiva, para el diagnóstico molecular de la infección por *L. infantum* tanto en perros como en gatos [33-35], y muestra valor diagnóstico de los resultados positivos para animales con enfermedad o infección activa, así como una coincidencia sustancial entre las pruebas serológicas y moleculares [34]. El objetivo del diagnóstico en el presente estudio era descubrir la exposición a picaduras de flebotomos infecciosos o las infecciones activas para las cuales ya se había producido la seroconversión. Por consiguiente, la variedad de resultados serológicos y moleculares observados refleja los distintos estadios de la infección en los que se pueden encontrar los animales expuestos. De acuerdo con esta variedad de patrones, es muy recomendable combinar pruebas de diagnóstico serológicas y moleculares cuando el propósito es determinar la exposición a la infección por *L. infantum*.

En muchos casos, los gatos infectados por *L. infantum* están aparentemente sanos y la progresión a la enfermedad clínica puede estar relacionada con trastornos inmunodepresores causados por enfermedades concurrentes. También se ha formulado para los gatos la hipótesis de predisposición natural hacia un patrón protector de respuesta inmunitaria celular a la infección por *Leishmania* [16]. Las infecciones retrovirales u otras enfermedades debilitantes (p. ej., neoplasias) se han asociado a veces con infección clínica (LF) o subclínica por *L. infantum* [14], pero no así en un estudio previo realizado en el archipiélago Eolio, donde estas infecciones son raras entre las poblaciones de gatos examinadas [20]. Además, debe tenerse en cuenta que la edad media de los animales incluidos era de menos de 3 años, y los gatos que dieron resultado positivo al cierre del estudio probablemente habían sido infectados por primera vez. Estos resultados pueden explicar la ausencia de casos clínicos de LF en gatos positivos de este estudio, aunque la leishmaniosis por lo general evoluciona como una

enfermedad crónica con un largo período de incubación [16].

El collar demostró ser seguro y, con la excepción de unas pocas reacciones locales en el lugar de aplicación, no se observaron acontecimientos adversos relacionados con el producto. Las reacciones locales consistieron sobre todo irritaciones dérmicas causadas probablemente por el roce mecánico del collar sobre el pelaje y la piel de los gatos, y fueron similares en frecuencia y tipología a las observadas en estudios previos [22, 23]. Todas las reacciones cutáneas se produjeron en las primeras semanas (1-4) tras la colocación del collar y remitieron espontáneamente después de aflojarlo un poco, con la excepción de un caso en el que el collar fue retirado para permitir un mejor tratamiento tópico de la lesión. La formulación de liberación lenta hace que el collar sea un producto ideal para los gatos, muy sensibles a los medicamentos, y permite el uso de flumetrina, un acaricida potente con propiedades repelentes de acción rápida, debido a las diferencias en la ruta metabólica en una especie a la que no se puede aplicar ningún otro de los piretroides actuales [21]. Otra característica del collar es su sistema de liberación de seguridad, que lo hace particularmente seguro para gatos de itinerancia libre. De hecho, aunque todos los gatos con collar incluidos en el estudio tenían acceso a actividades al aire libre, no se observó ni un solo caso de enganche o estrangulamiento causado por el collar.

El estudio entomológico confirmó la presencia de vectores competentes de *L. infantum* en todos los puntos controlados, concretamente, *P. perniciosus* y *P. neglectus*, ambos considerados como los principales vectores de *L. infantum* en la cuenca mediterránea. Estos resultados concuerdan con los de estudios previos realizados recientemente en la misma latitud [29]. Pocos estudios han investigado las poblaciones de flebotomos en las islas Eolias, y en el único estudio llevado a cabo en el mismo archipiélago (islas Lipari y Filicudi) con trampas adhesivas, *P. perniciosus* fue la única especie capturada [36]. Por lo tanto, el presente estudio complementa el número de especies de flebotomos notificadas en el archipiélago con otras dos especies, una de las cuales (*P. neglectus*) es un vector comprobado de *L. infantum*. Es interesante señalar que durante el estudio se encontró *P. perniciosus* en puntos situados en distintos entornos, es decir, urbano, periurbano y rural. Sin embargo, la mayor presencia y actividad de *P. perniciosus* se registró

en los entornos rurales de las islas Lipari y Vulcano, con una actividad constante desde finales de mayo hasta octubre y picos en julio y agosto. Esto puede representar el período de mayor riesgo de exposición a la infección por *L. infantum*, especialmente a mediados del verano, cuando los turistas y sus animales llegan en grandes cantidades para pasar las vacaciones en estas islas.

Conclusiones

El estudio demuestra que el collar Seresto®, que contiene una combinación de imidacloprid y flumetrina, es seguro y eficaz para reducir el riesgo de infección por *L. infantum* en gatos. El collar representa por el momento la única medida preventiva posible frente a la LF. El tratamiento debería adoptarse bien como una estrategia para proporcionar protección individual tanto a los gatos que viven en áreas endémicas de *L. infantum* como a los que viajan a ellas, o bien para reducir el número de gatos infectados y que actúan como reservorio del patógeno.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico; EDTA: ácido etilendiaminotetracético; LF: leishmaniosis felina; VLF: virus de la leucemia felina; VIF: virus de la inmunodeficiencia felina; IFAT: prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes; qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real; DE: día del estudio; ETV: enfermedad transmitida por vectores; IBA: incidencia bruta anual.

Agradecimientos

No procede.

Financiación

Este estudio fue financiado por Bayer Animal Health. Bayer estuvo directamente implicado en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de los datos, la decisión de publicar el artículo, así como su preparación.

Disponibilidad de datos y materiales

Los datos que respaldan los resultados de este estudio están disponibles en Bayer Animal Health pero se aplican restricciones a la disponibilidad de los mismos, que han sido utilizados bajo licencia para el estudio actual y, por consiguiente, no están a disposición del público. Sin embargo, los datos están disponibles bajo petición razonable a los autores y con el permiso de Bayer Animal Health.

Contribuciones de los autores

Concepción, diseño y supervisión del estudio: EB, DO, FDT, FSB, MP y KD. Realización de los experimentos: EB, LF, EN, GG, LG, MGP, VP, MSL, VDT y VC. Análisis de los datos: FSB, EB, DO, MP y GC. Aportación de reactivos, materiales y herramientas de análisis: EB, SG, MGP, DO, FSB, RN, KD, MP y GC. Redacción del artículo: EB y DO, con la contribución de los coautores. Todos los autores han leído y aprobado la versión final del artículo.

Aprobación ética

El protocolo del estudio y los procedimientos de investigación han sido aprobados por el Ministerio de Sanidad italiano (n.º de autorización 0006088-10/03/2015-DGSAF-COD_UO-P). Los animales se incluyeron en el estudio solamente tras la firma de un consentimiento informado por parte de sus dueños.

Consentimiento para la publicación

No procede.

Conflictos de intereses

KD y MP son empleados de Bayer Animal Health, que ha financiado el estudio. FSB y RN son empleados de Arcoblu s.r.l., que ha actuado como CRO y supervisado el estudio.

Nota del editor

Springer Nature se mantiene neutral con respecto a las reclamaciones jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.

Información sobre los autores

1Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina (Italia). 2Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, Bari (Italia). 3Arcoblu s.r.l., Milán (Italia). 4Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen (Alemania). 5Médico veterinario, Ambulatorio Veterinario S. Lucia, Via F. Crispi 56, Lipari (Italia). 6Istituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Recife (Brasil). 7Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Parassitologia, Legnano (Italia).

Recibido: 26 de abril de 2017 Aceptado: 20 de junio de 2017

Publicado en Internet: 14 de julio de 2017

Bibliografía

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7:e35671.
2. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis. *Europe Emerg Infect Dis*. 2008;14:1013-8.
3. Gramiccia M. Recent advances in leishmaniasis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*. 2011;181:23-30.
4. Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol*. 2013;29:339-45.
5. Sergent ED, Sergent ET, Lombard J, Quilichini M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bull Soc Pathol Exot*. 1912;2:93-8.
6. Kirkpatrick CE, Farrell JP, Goldschmidt MH. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Exp Parasitol*. 1984;58:125-31.
7. Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet Parasitol*. 2010;174:37-42.
8. Mancianti F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia*. 2004;46:203-6.
9. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infección by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol*. 2007;145:267-73.
10. Nasereddin A, Salant H, Abdeen Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Vet Parasitol*. 2008;158:364-9.
11. Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, et al. Feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol*. 2002;106:181-91.
12. Sarkari B, Hatam GR, Adnani SJ, Asgari Q. Seroprevalence of feline leishmaniasis in areas of Iran where *Leishmania infantum* is endemic. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009;103:275-7.
13. Maia C, Campino L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol*. 2011;27:341-4.
14. Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Mirò G, et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2015;8:302.
15. Navarro JA, Sánchez J, Peñafiel-Verdú C, Buendía AJ, Altimira J, Vilafranca M. Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniasis. *J Comp Pathol*. 2010;143:297-302.
16. Soares CS, Duarte SC, Sousa SR. What do we know about feline leishmaniasis? *J Feline Med Surg*. 2016;18:435-42.
17. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013;27:123-47.
18. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sand flies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 2007;145:357-60.
19. da Silva SM, Rabelo PF, Gontijo N de F, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet Parasitol*. 2010;174:150-4.
20. Otranto D, Napoli E, Latrofa MS, Annoscia G, Tarallo VD, Greco G, et al. Feline and canine leishmaniasis and other vector-borne diseases in Aeolian islands: pathogen and vector circulation in a confined environment. *Vet Parasitol*. 2017;236:144-51.
21. Linnett PJ. Permethrin toxicosis in cats. *Aust Vet J*. 2008;86:32-5.
22. Stanneck D, Rass J, Radeloff I, Krudewagen E, Le Sueur C, Hellmann K, et al. Evaluation of the long-term efficacy and safety of an imidacloprid 10%/ flumethrin 4.5% polymer matrix collar Seresto® in dogs and cats naturally infested with fleas and/or ticks in multi-centre clinical field studies in Europe. *Parasit Vectors*. 2012;5:66.
23. Stanneck D, Krudewagen EM, Fourie JJ, Horak IG, Davis W, Krieger KJ. Efficacy of an imidacloprid/flumethrin collar against fleas and ticks on cats. *Parasit Vectors*. 2012;5:82.
24. Otranto D, Dantas-Torres F, de Caprariis D, Di Paola G, Tarallo VD, Latrofa MS, et al. Prevention of canine leishmaniasis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin. *PLoS One*. 2013;8:e56374.
25. Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Solari Basano F, et al. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2014;7:327.
26. Brianti E, Napoli E, Gaglio G, Falsone L, Giannetto S, Solari Basano F, et al. Field evaluation of two different treatment approaches and their ability to control fleas and prevent canine leishmaniasis in a highly endemic area. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004987.
27. Otranto D, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa MS, Diniz PP, de Caprariis D, et al. Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3316-24.
28. Dantas-Torres F, Latrofa MS, Otranto D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors*. 2011;4:56.
29. Gaglio G, Brianti E, Napoli E, Falsone L, Dantas-Torres F, Tarallo VD, et al. Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. *Acta trop*. 2014;133:73-7.
30. Dantas-Torres F, Tarallo VD, Otranto D. Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasit Vectors*. 2014;7:479.
31. Chatzis MK, Andreadou M, Leontides L, Kasabalas D, Mylonakis M, Koutinas AF, et al. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. *Vet Parasitol*. 2014;202:217-25.
32. Chatzis MK, Leontides L, Athanasiou LV, Papadopoulos E, Kasabalas D, Mylonakis M, et al. Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Exp Parasitol*. 2014;147:54-9.
33. Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet Parasitol*. 2012;184:10-7.
34. Di Muccio T, Veronesi F, Antognoni MT, Onofri A, Piergilli Fioretti D, Gramiccia M. Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2651-9.
35. Oliveira GC, Paiz LM, Menozzi BD, Lima Mde S, de Moraes CC, Langoni H. Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2015;24:464-70.
36. Maroli M, Lavagnino A, Ansaldo G, Cavallini C. Leishmaniasis vectors (Diptera, Psychodidae) in 3 different environments of western Sicily and 2 of the Aeolian Islands. *Parassitologia*. 1990;32:305-11.
37. Envíe su próximo artículo a BioMed Central y le ayudaremos paso a paso:
38. Aceptamos consultas previas al envío
39. Nuestra herramienta de selección le ayuda a encontrar la revista más relevante
40. Brindamos asistencia al cliente las 24 horas
41. Un cómodo envío por Internet
42. Una escrupulosa revisión por expertos
43. Inclusión en PubMed y todos los principales servicios de indexación
44. Máxima visibilidad de su investigación
45. Envíe su manuscrito a www.biomedcentral.com/submit

Envíe su próximo artículo a BioMed Central y le ayudaremos paso a paso:

- Aceptamos consultas previas al envío
- Nuestra herramienta de selección le ayuda a encontrar la revista más relevante
- Brindamos asistencia al cliente las 24 horas
- Un cómodo envío por Internet
- Una escrupulosa revisión por expertos
- Inclusión en PubMed y todos los principales servicios de indexación
- Máxima visibilidad de su investigación

Envíe su manuscrito a



www.biomedcentral.com/submit