



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE COLEIRAS IMPREGNADAS
COM DELTAMETRINA NO CONTROLE E PREVENÇÃO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA ENDÊMICA**

BRUNA MARTINS MACEDO LEITE

Salvador - Bahia

2016

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE COLEIRAS IMPREGNADAS
COM DELTAMETRINA NO CONTROLE E PREVENÇÃO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA ENDÊMICA**

BRUNA MARTINS MACEDO LEITE

Orientação: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Co-orientação: Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa para
obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Bahia

2016

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

L533a Leite, Bruna Martins Macedo.
Avaliação da eficácia de coleiras impregnadas com deltametrina no controle e prevenção da leishmaniose visceral canina em área endêmica. / Bruna Martins Macedo Leite. - 2016.
88 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras, Laboratório de Patologia e Biointervenção.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2016.

1. Leishmaniose visceral. 2. Cães. 3. Medida de controle. 4. Coleira. I. Título.

CDU 616.993.161

“AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE COLEIRAS IMPREGNADAS COM DELTAMETRINA NO CONTROLE E PREVENÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA ENDÊMICA.”

BRUNA MARTINS MACEDO LEITE

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Carlos Antônio de Souza Teles Santos
Pesquisador
FIOCRUZ/CPqGM



Dr. Federico Costa
Professor Adjunto
UFBA



Dra. Maria da Conceição Chagas de Almeida
Pesquisadora Titular
FIOCRUZ/CPqGM

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha irmã que são meu porto seguro, essa vitória também é
deles.

Ao meu namorado, Antenor Neto, por todo apoio e pela paciência, principalmente na
reta final.

A toda família e aos amigos que sempre estiveram presentes, apoiando e
incentivando

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho:

À minha orientadora, Dra. Patrícia Veras, pela oportunidade, pelos ensinamentos transmitidos e pelo tempo dedicado para realização do projeto.

À minha co-orientadora, Dra. Deborah Fraga, pelo tempo que também dedicou para realização desse trabalho, pela paciência e pelos valiosos ensinamentos.

À Manuela Solcà por toda ajuda em campo, principalmente quando estive ausente.

Aos alunos de iniciação científica, em especial Liliane, Lívia, Yuri e Junior Guedes, pelo apoio no trabalho de campo.

À Leila Amorim pela colaboração e ajuda nas análises estatísticas.

A equipe de veterinários do Centro de Controle de Zoonoses, Gilmar, Adriana e Sandra, por permitirem a realização do projeto no município e por sempre nos apoiarem.

Aos agentes de saúde do município de Camaçari, pelo apoio no trabalho de campo.

Aos amigos do LPBI 1 pelo apoio durante a realização do trabalho.

À Fiocruz e ao CPqGM, pela infraestrutura física e pessoal, que possibilitaram a execução do projeto.

À equipe da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna (CPqGM), pela revisão e pelo apoio nas correções na dissertação.

À Lucas Donato e Rafaella Silva do Ministério da Saúde pelo fornecimento das coleiras impregnadas com deltametrina.

À FAPESB.

Vá firme na direção das suas metas,
porque o pensamento cria,
o desejo atrai e a fé realiza

(Autor desconhecido)

LEITE, Bruna Martins Macedo. Avaliação da eficácia de coleiras impregnadas com deltametrina no controle e prevenção da leishmaniose visceral canina em área endêmica. 88 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de grande importância na saúde pública, causada pela *Leishmania infantum*. No Brasil, o parasito é transmitido pela picada do *Lutzomyia longipalpis* e o cão é considerado o principal reservatório doméstico. As medidas de controle da LV apresentam limitações que comprometem a sua eficácia. Assim, novas estratégias precisam ser implementadas. A utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% têm apresentado resultados promissores na proteção individual de cães contra a picada do vetor flebotômico e como medida de controle em regiões endêmicas da Europa. Entretanto, ainda são escassos os estudos de campo que avaliaram a eficácia da utilização da coleira como medida de controle da LV em áreas onde o *Lu. longipalpis* é o vetor responsável pela transmissão. **OBJETIVO:** Avaliar a eficácia da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em cães, no controle e prevenção da leishmaniose visceral canina (LVC) em uma área endêmica do Brasil. **MATERIAL E MÉTODOS:** Um estudo experimental longitudinal foi realizado em Camaçari - BA. A localidade foi dividida em: i) área intervenção, onde os cães soronegativos utilizaram uma coleira com deltametrina e ii) área controle, onde os cães soronegativos foram acompanhados, mas não utilizaram a coleira. Nas duas áreas foram realizadas três avaliações sorológicas dos cães domiciliados e semi-domiciliados e duas trocas de coleira na área intervenção. Os animais foram identificados pelo preenchimento de uma ficha e foram testados para LVC pelo TR DPP®LVC Bio-Manguinhos e pelo EIE®LVC Bio-Manguinhos. Os cães soropositivos foram recolhidos pelo CCZ para eutanásia e os soronegativos foram acompanhados. Bancos de dados foram construídos no programa doForms™4.1.1 e analisados no EPI INFO™7 para calcular as taxas de soroprevalência e de incidência e compará-las entre os grupos, e o programa STATA®12 foi utilizado para realizar a análise de sobrevivência, utilizando o modelo de Cox. **RESULTADOS:** No primeiro inquérito, a soroprevalência foi semelhante nas duas áreas, 26% na área intervenção e 31,9% na área controle. No segundo inquérito, houve redução significativa da soroprevalência nas duas áreas, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre as áreas. No terceiro inquérito, houve redução da soroprevalência na área intervenção e aumento na área controle. Assim, a soroprevalência foi significativamente maior na área controle e a razão de risco calculada apontou para proteção contra LVC em decorrência do uso da coleira entre os cães da área intervenção. Em relação a incidência da LVC, a taxa de proteção contra doença foi de 49% no último inquérito, entre os cães da área intervenção, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa entre as áreas. As curvas de sobrevivência das duas áreas do estudo foram comparadas pelo teste de Wilcoxon e o resultado foi estatisticamente significativo ($p=0,0074$). No modelo de Cox, a proteção contra LVC foi de 51% na área intervenção, entretanto não houve associação significativa entre a soroconversão dos cães e a área de estudo a qual eles pertenciam ($p=0,104$). **CONCLUSÃO:** A avaliação da eficácia do uso da coleira como medida de controle não apresentou resultados conclusivos e a sua implementação representa um desafio operacional para as autoridades de saúde. **Palavras-chave:** Leishmaniose visceral, Cães, Medidas de controle, Coleira

LEITE, Bruna Martins Macedo. Evaluation the efficacy of collars impregnated with deltamethrin in the control and prevention of canine visceral leishmaniasis in endemic areas. 88 f. il. Dissertation (Master em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis of great importance in public health, caused by *Leishmania infantum*. In Brazil, the parasite is transmitted by the bite of *Lutzomyia longipalpis* and the dog is considered the main domestic reservoir. The VL control measures have limitations that impair its efficacy. Thus, new strategies need to be implemented. The use of collars impregnated with deltamethrin 4% have shown promising results in personal protection dogs against the bite of the sandfly vector and as a control measure in endemic regions of Europe. However, there are few field studies that evaluated the efficacy of using the collar as LV control measure in areas where *Lu. longipalpis* is the vector responsible for transmission.

OBJECTIVE: To evaluate the efficacy of using collars impregnated with deltamethrin to 4% in dogs for control and prevention of canine visceral leishmaniasis (CVL) in an endemic area of Brazil. **MATERIAL AND METHODS:** A longitudinal experimental study was carried out in Camaçari-BA. The locality was divided into: i) intervention area where seronegative dogs used a collar with deltamethrin and ii) control area, where seronegative dogs were followed, but did not use the collar. In both areas three serologic evaluations of domiciled and semi-domiciled dogs and two collar exchanges in the intervention area were performed. Animals were identified by filling out a form and have been tested for CVL by TR DPP®LVC Bio-Manguinhos and the EIE®LVC Bio-Manguinhos. The seropositive dogs were collected by the CCZ to euthanasia and seronegative were followed. Databases were built in doFormsTM4.1.1 program and analyzed in EPI INFO™7 to calculate prevalence and incidence rates and compare them between the groups, and STATA®12 program was used to perform the survival analysis, using the model Cox. **RESULTS:** In the first survey, the seroprevalence was similar in both areas, 26% in the intervention area and 31.9% in the control area. In the second survey, there was a significant reduction in prevalence in both areas, but no statistically significant difference between the areas was observed. In the third survey, there was reduction of seroprevalence in the intervention area and increased in the control area. Thus, the seroprevalence was significantly higher in the control area and the risk ratio calculated pointed to CVL protection due to the use of the collar between the dogs from the intervention area. Regarding the incidence of CVL, disease protection rate was 49% in the last survey, among dogs of the intervention area, however the difference was not statistically significant between the areas. The survival curves of the two areas of study were compared using the Wilcoxon test and the result was statistically significant ($p=0.0074$). In the Cox model, protection against CVL was 51% in the intervention area, however there was no significant association between seroconversion of dogs and the study area to which they belong ($p=0.104$). **CONCLUSION:** Evaluation of the efficacy of the use of the collar as a control measure did not present conclusive results and its implementation is an operational challenge for health authorities.

Keywords: Visceral leishmaniasis, Dogs, Control measures, Collar

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Ciclo biológico de <i>L. infantum</i>	19
Figura 2 Localidade de Monte Gordo dividida em área intervenção e área controle...29	
Figura 3 Fluxograma da avaliação sorológica dos cães incluídos no estudo.....31	
Figura 4 Localidade de Monte Gordo dividida em área intervenção e área controle após o recorte	35
Figura 5 Fluxograma das avaliações sorológicas realizados nos cães incluídos no estudo de coorte aberta da área intervenção em Monte Gordo – Camaçari.....41	
Figura 6 Fluxograma das avaliações sorológicas realizados nos cães incluídos no estudo de coorte aberta da área controle em Monte Gordo – Camaçari.....42	
Figura 7 Fluxograma das avaliações sorológicas realizados nos cães incluídos no estudo experimental de coorte fechada da área intervenção em Monte Gordo – Camaçari.....45	
Figura 8 Fluxograma das avaliações sorológicas realizados nos cães incluídos no estudo experimental de coorte fechada da área controle em Monte Gordo – Camaçari.....46	
Figura 9 Curvas de sobrevivência estimadas por Kaplan-Meier, considerando a soroconversão dos cães das áreas do estudo. Monte Gordo – Camaçari.....48	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Períodos de realização dos inquéritos sorológicos nas áreas de estudo na localidade de Monte Gordo – Camaçari.....	36
Tabela 2	Caracterização dos cães avaliados no primeiro inquérito sorológico das áreas de estudo na localidade de Monte Gordo – Camaçari.....	37
Tabela 3	Número de cães avaliados segundo a área de estudo e o momento da avaliação. Monte Gordo – Camaçari.....	39
Tabela 4	Perda de seguimento de cães durante o estudo longitudinal, segundo o motivo da perda, a área de estudo e o momento da avaliação em Monte Gordo – Camaçari.....	40
Tabela 5	Número de cães da área intervenção que permaneceram com a coleira no pescoço até a sua troca, segundo o momento da avaliação sorológica. Monte Gordo – Camaçari.....	43
Tabela 6	Taxa de soroprevalência da LVC segundo a área de estudo e o momento da avaliação sorológica. Monte Gordo – Camaçari.....	44
Tabela 7	Taxa de incidência da LVC segundo a área de estudo e o momento da avaliação sorológica. Monte Gordo – Camaçari.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA	Bahia
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
EIE® LVC	Ensaio Imunoenzimático ELISA para Leishmaniose Visceral Canina
ELISA Enzimática	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / Ensaio de Imunoabsorção
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IC	Intervalo de Confiança
IFI® LVC	Imunofluorescência Indireta para Leishmaniose Visceral Canina
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
Km	Quilômetro
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz
LPBI	Laboratório de Patologia e Biointervenção
<i>Lu. cruzi</i>	<i>Lutzomyia cruzi</i>
<i>Lu. intermedia</i>	<i>Lutzomyia intermedia</i>
<i>Lu. longipalpis</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
<i>Lu. migonei</i>	<i>Lutzomyia migonei</i>
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MS	Ministério da Saúde
PVC	Policloreto de Polivinila
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RMS	Região Metropolitana de Salvador
RR	Razão de Risco
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TR DPP®LVC Teste rápido Dual Path Platform para Leishmaniose Visceral Canina

UFBA Universidade Federal da Bahia

VPP Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	EPIDEMIOLOGIA DA LV.....	16
2.2	CICLO BIOLÓGICO DA LV.....	18
2.3	AGENTE ETIOLÓGICO	17
2.4	HOSPEDEIRO INVERTEBRADO (VETOR).....	20
2.5	RESERVATÓRIO VERTEBRADO	20
2.6	CONTROLE DA LV.....	21
3	HIPÓTESE	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	ÁREA DO ESTUDO	28
5.2	DESENHO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS	28
5.3	COLETA DE AMOSTRA E DIAGNÓSTICO DA LVC	30
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5.5	ASPECTOS ÉTICOS	33
6	RESULTADOS	34
6.1	DINÂMICA DO ESTUDO EXPERIMENTAL	34
6.2	DINÂMICA DO ESTUDO EXPERIMENTAL APÓS O RECORTE DAS ÁREAS DE ESTUDO.....	35
6.3	DINÂMICA DO ESTUDO EXPERIMENTAL DE COORTE CANINA ABERTA.....	37
6.4	AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA NO USO DA COLEIRA IMPREGNADA COM DELTAMETRINA A 4%	42
6.5	TAXA DE SOROPREVALÊNCIA NA COORTE CANINA ABERTA.....	43
6.6	DINÂMICA DO ESTUDO EXPERIMENTAL DE COORTE CANINA FECHADA	44
6.7	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	47
7	DISCUSSÃO	49
8	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO – ARTIGO	62

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica e de curso crônico (GONTIJO, MELO, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Devido a sua ampla distribuição e alta letalidade, essa doença apresenta grande importância para saúde pública (ALVAR, 2012). Nas Américas, a LV é uma zoonose, causada pela *Leishmania infantum* (MICHALICK, GENARO, 2005). No Brasil, a doença ocorre em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões do país, apresentando maior número de casos na região Nordeste (SINAN/SVS/MS, 2014).

O parasita é transmitido para o homem e para outros mamíferos pela picada de fêmeas de flebotomíneos (ALVAR *et al.*, 2004), sendo a *Lutzomyia longipalpis*, a principal espécie de flebótomo envolvida na transmissão da LV no Brasil (LAINSON, RANGEL, 2005; RANGEL, VILELA, 2008). O cão doméstico é considerado o principal reservatório urbano desse parasita, apresentando grande importância na epidemiologia da LV (BEVILACQUA *et al.*, 2001; MARZOCHI *et al.*, 1985; SHERLOCK, 1996).

As medidas de controle atualmente preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS) do Brasil para profilaxia da LV consistem em: I) diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos; II) redução da população de flebotomos com a pulverização de residências com inseticidas de ação residual; III) inquérito sorológico dos cães e eutanásia dos soropositivos; IV) investimento na educação em saúde, no intuito de conscientizar a população sobre a doença (BRASIL, 2006). Estudos mostram que estas medidas de controle apresentam limitações, como alto custo e dificuldades operacionais, que as tornam pouco eficazes e apontam para a necessidade de implementação de novas estratégias que possam contribuir para a prevenção da doença (GONTIJO, MELO, 2004; OLIVEIRA, MORAIS, MACHADO-COELHO, 2008).

Dentre as estratégias de controle alternativas, estudos experimentais têm mostrado que flebotomos são susceptíveis à deltametrina em baixas concentrações (FALCÃO, PINTO, GONTIJO, 1988) e que a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% apresentam resultados promissores na proteção individual de cães contra a picada do vetor flebotomíneo (REITHINGER, TEODORO, DAVIES, 2001). Killick-Kendrick e colaboradores (1997) e David e colaboradores (2001) relataram que coleiras plásticas impregnadas com deltametrina a 4% protegeram os cães contra 96% das picadas dos flebotomíneos e essa proteção permaneceu efetiva por até 8

meses. Apesar da prevenção de picadas dos vetores interromper o ciclo de transmissão da *Leishmania* e prevenir que a infecção ocorra (MIRÓ *et al.*, 2008), existem poucos estudos de campo que avaliem a eficácia da coleira impregnada com deltametrina aplicada como medida de controle, interferindo no ciclo de transmissão da doença.

Estudos de campo realizados em áreas endêmicas da Itália (FERROGLIO, POGGI, TRISCIUOGLIO, 2007; FOGLIA MANZILLO *et al.*, 2006; MAROLI *et al.*, 2001) e do Irã (GAVGANI *et al.*, 2002) mostraram que a implementação da coleira impregnada com deltametrina como forma de controle da leishmaniose visceral canina (LVC), reduziu significativamente a taxa de soroconversão dos cães. Entretanto, os vetores responsáveis pela transmissão da *Leishmania* nas áreas estudadas é o *Phlebotomus perniciosus* e o *Phlebotomus kandelaki*, vetores diferentes do *Lu. longipalpis* presente no Brasil.

No Brasil, Reithinger *et al.* (2004), utilizando um modelo matemático, estimaram que o uso de coleiras impregnadas com deltametrina como forma de controle da LVC em uma região endêmica do país teria impacto epidemiológico maior do que a eutanásia de cães soropositivos. Camargo-Neves (2011), associou o uso de coleiras impregnadas com deltametrina à eutanásia de cães soropositivos em um município endêmico de São Paulo e observou uma redução significativa na taxa de incidência da LVC. No entanto, o desenho do estudo apresenta limitações, pois os animais estudados foram diagnosticados pela reação de imunofluorescência indireta (IFI® LVC Bio-Manguinhos) em eluato de sangue dessecado em papel filtro, que apresenta baixa especificidade, além de não ter comparado os resultados obtidos na área tratada com os obtidos em uma área controle, sem implementação da coleira (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

Diante do exposto, esse estudo propõe-se a avaliar a redução da taxa de incidência da LVC por meio da utilização de coleira impregnada com deltametrina em cães de uma área endêmica comparando com resultados obtidos em uma área controle. Nossa hipótese é que a coleira impregnada com deltametrina a 4%, quando usada como medida de controle, é eficaz na redução das taxas de incidência de LVC em áreas endêmicas. Os animais do estudo foram diagnosticados com o TR-DPP® LVC e o EIE® LVC Bio-Manguinhos, que são testes sorológicos com maior especificidade em relação ao IFI® LVC Bio-Manguinhos, reduzindo assim o número de cães falso-positivos (FRAGA *et al.*, 2016); o uso das coleiras foi realizado em

concomitância com as medidas oficiais de controle; e a taxa de incidência foi medida na área intervenção e em uma área controle com características similares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA LV

As leishmanioses representam um sério problema de saúde pública devido à sua ampla distribuição geográfica, presentes em 5 continentes e endêmicas em 98 países, sendo a LV a forma mais grave da doença (ALVAR *et al.*, 2012; DESJEUX, 2004; WHO, 2013). A LV acomete aproximadamente 300 mil pessoas no mundo a cada ano, com 90% dos casos concentrados em apenas 6 países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2015). Em alguns países, como os da América Latina, predomina a forma antroponóptica da doença e entre os casos notificados, prevalece a ocorrência da LV em indivíduos do sexo masculino, com baixa escolaridade e em crianças com menos de 10 anos de idade (ALMEIDA *et al.*, 2005; BEVILACQUA *et al.*, 2001; QUINTANILHA *et al.*, 2016; ORTIZ e ANVERSA, 2015).

Inicialmente, a LV era considerada uma doença de caráter eminentemente rural (SOUZA, JESUS, TEIXEIRA, 2014). Nas últimas décadas, observou-se mudanças no seu padrão de transmissão, adquirindo um caráter urbano, seguido de um preocupante aumento no número de casos da doença e sua expansão em várias partes do mundo (DESJEUX, 2004; MENEZES *et al.*, 2016; ORTIZ, ANVERSA, 2015). No Brasil, foram registrados 1944 casos da doença em 1990, aumentando para 3253 casos em 2013. Entre os casos registrados em 2013, 54% ocorreram na região Nordeste (SINAN/SVS/MS, 2014).

A mudança no padrão de transmissão da LV e o incremento no número de casos da doença estão relacionados principalmente aos movimentos migratórios de pessoas e de animais domésticos, motivados pelos longos períodos de seca e pelos fatores socioeconômicos, que levaram a um adensamento urbano e às mudanças ambientais, causadas pelo intenso desmatamento (ARIAS, MONTEIRO, ZICKER, 1996; DESJEUX, 2001; MENDES *et al.*, 2002). A ocupação das áreas urbanas periféricas por migrantes procedentes de regiões endêmicas e a presença do vetor nessas áreas, proporciona maior exposição de indivíduos susceptíveis à fonte de infecção (COSTA, PEREIRA, ARAÚJO, 1990).

As más condições de moradia nas periferias, o nível socioeconômico da população e a falta de saneamento básico nessas áreas estão associados a ocorrência da LV no meio urbano (BELO *et al.*, 2013; LÓPEZ *et al.*, 2016; MORENO

et al., 2005; YARED *et al.*, 2014). Ademais, outros fatores de risco domiciliares e peridomiciliares podem favorecer a reprodução e sobrevivência do vetor e conseqüentemente contribuir para maior ocorrência da doença, como: I) presença de vegetação próximo ao domicílio (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013); II) presença de cães na residência (LÓPEZ *et al.*, 2016; YARED *et al.*, 2014); III) presença de matéria orgânica nos quintais (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013) e IV) criação de outros animais, como galinhas e suínos (AZEVEDO *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2003).

A expansão da LV também pode ser atribuída a outros elementos, como a capacidade de adaptação do vetor em diferentes ambientes e às limitações das medidas de controle atuais (OLIVEIRA, MORAIS, MACHADO-COELHO, 2008; RANGEL, VILELA, 2008; SHERLOCK, 1996).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

As leishmanioses são causadas por protozoários intracelulares pertencentes à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania* (FRAGA *et al.*, 2010; REY, 2008). Em 1937, Cunha e Chagas descreveram a *Leishmania chagasi* como a espécie causadora da LV nas Américas, enquanto a *L. infantum* era a espécie apontada como responsável pela ocorrência da doença na Europa (MICHALICK, GENARO, 2005). Estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares, demonstraram que não há distinção genética entre essas espécies e uma espécie pode ser citada como sinônimo da outra (FRAGA *et al.*, 2010; MAURICIO *et al.*, 1999). Acredita-se que o parasita tenha sido transportado para América do Sul durante a colonização, em cães infectados na Europa (BATISTA *et al.*, 2012; MAURICIO *et al.*, 2000).

A *L. infantum* pertence ao complexo *Leishmania donovani* e o seu ciclo biológico é heteroxênico, necessitando de dois hospedeiros para completar o ciclo (MAURICIO *et al.*, 1999; SCHLEIN, 1993). O hospedeiro invertebrado, representado pelo vetor flebotomíneo, alberga a forma flagelada e infecciosa do parasito, denominada promastigotas, enquanto o hospedeiro vertebrado alberga a forma aflagelada do parasito denominada de amastigota (MICHALICK, GENARO, 2005; SCHLEIN, 1993).

2.3 CICLO BIOLÓGICO DA LV

O vetor flebotomíneo (tópico 2.4) durante o repasto sanguíneo inocula na derme de hospedeiros vertebrados (tópico 2.5) seus componentes salivares, substâncias imunomoduladoras e a forma infectante da *Leishmania*, as promastigotas metacíclicas (KAYE, SCOTT, 2011; SANTOS-GOMES, CAMPINO, ABRANCHES, 2000; SCHLEIN, 1993). Após a regurgitação de promastigotas metacíclicas na derme de hospedeiros vertebrados, os protozoários são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente por neutrófilos e macrófagos (CUNHA, 1938; PETERS *et al.*, 2008; SANTOS-GOMES, CAMPINO, ABRANCHES, 2000; SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2007). As promastigotas induzem a formação de vacúolos fagolisossomais no interior das células hospedeiras, células pertencentes à linhagem monocítica. Dentro desses vacúolos parasitóforos, as promastigotas perdem o flagelo, transformam-se nas formas de amastigotas e proliferam por divisão binária (ALEXANDER, SATOSKAR, RUSSEL, 1999; ANTOINE *et al.*, 1990; CHANG, DWYER, 1978; KAYE, SCOTT, 2011; PETERS *et al.*, 2008; SANTOS-GOMES, CAMPINO, ABRANCHES, 2000).

O ciclo biológico da LV (Figura 1) é concluído quando fêmeas flebotomíneas, durante o repasto sanguíneo, ingerem fagócitos infectados com amastigotas, presentes na derme do hospedeiro vertebrado (CUNHA, 1938; SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2007, 2009). As amastigotas são liberadas no intestino médio do vetor, onde ocorre a transformação para a forma promastigota metacíclica. As promastigotas metacíclicas migram para válvula estomodeal do vetor e o ciclo de transmissão é reiniciado em um novo repasto sanguíneo (ALEXANDER, SATOSKAR, RUSSEL, 1999; KAYE, SCOTT, 2011; SCHLEIN, 1993).

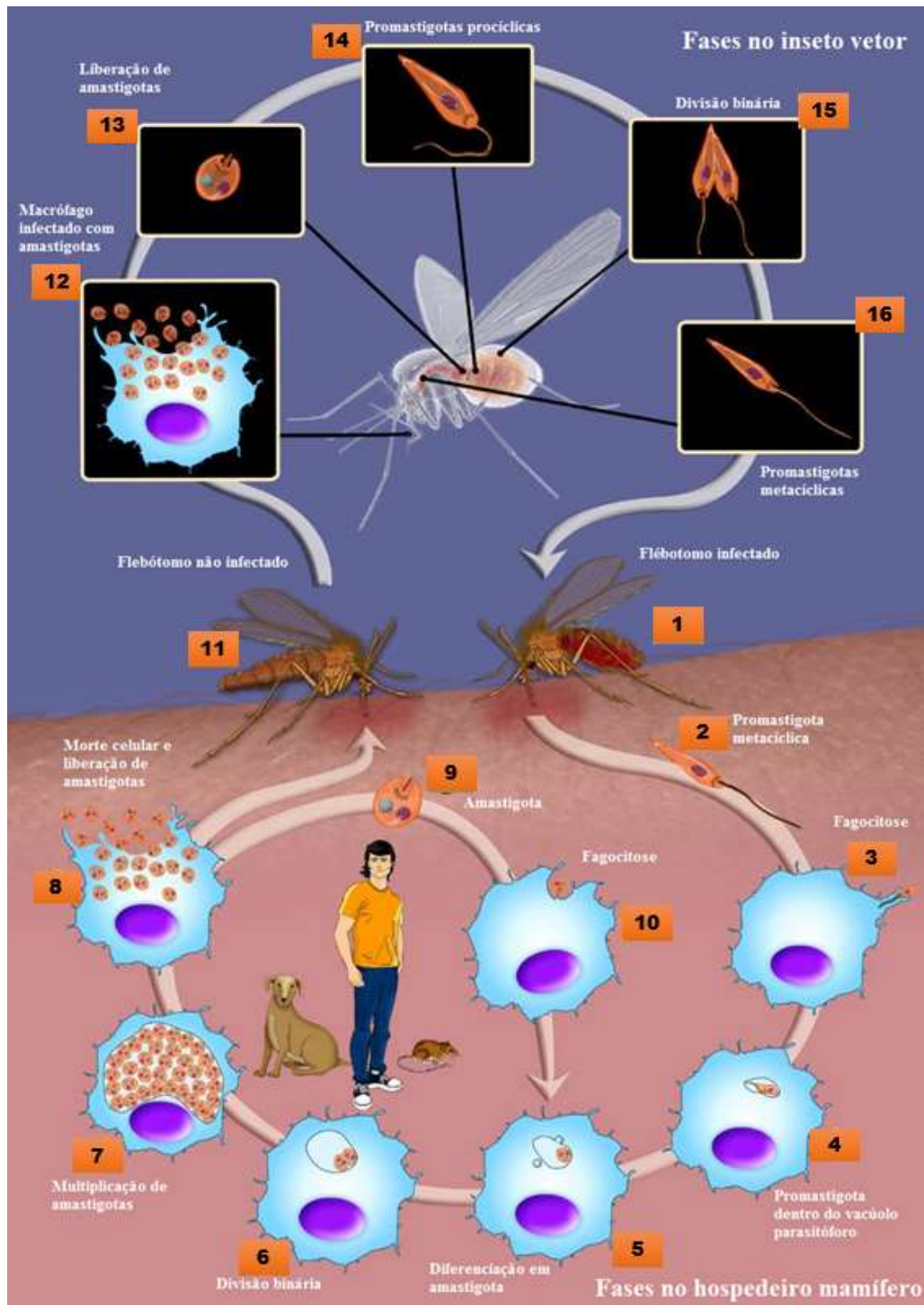


Figura 1 - Ciclo biológico de *L. infantum*. A figura representa o ciclo biológico do parasito *L. infantum* nas fases que infecta hospedeiros invertebrados e hospedeiros vertebrados. **1, 2:** as formas promastigotas metacíclicas (infectantes) são regurgitadas durante o repasto sanguíneo; **3, 4:** as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico (principalmente macrófagos e neutrófilos) e formam o vacúolo parasitóforo; **5:** as promastigotas diferenciam-se em amastigotas; **6, 7:** as amastigotas multiplicam-se por divisão binária; **8:** a membrana da célula parasitada rompe-se e as amastigotas são liberadas; **9, 10:** as amastigotas podem ser fagocitadas por novas células; **11:** as amastigotas podem ser sugadas por um novo vetor; **12:** o inseto ingere macrófagos albergando o parasito; **13:** as formas amastigotas dos parasitos deixam os macrófagos no trato digestório do inseto; **14, 15, 16:** no trato digestório do inseto os parasitos transformam-se em formas promastigotas móveis e passam a se replicar, reiniciando o ciclo. Figura adaptada de TEIXEIRA *et al*, 2013.

2.4 HOSPEDEIRO INVERTEBRADO (VETOR)

A transmissão da *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado ocorre pela picada de flebotomíneos fêmeas hematófagas pertencentes à família Psychodidae (ABREU-SILVA *et al.*, 2008; ALVAR *et al.*, 2004).

No Brasil, o *Lutzomyia longipalpis* é considerado como o principal vetor biológico da LV por atender aos critérios estabelecidos para competência vetorial, tais como: I) a distribuição geográfica desse flebotomíneo no Brasil sobrepõe à distribuição dos casos de LV humana e canina (ABREU-SILVA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2005), II) a ocorrência de infecção natural do *Lu. longipalpis* por *L. infantum* nos locais onde são registrados casos humanos (SILVA *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2010) e III) seu hábito antropofílico, estando bem adaptado ao ambiente peridomiciliar e alimentando-se de sangue de animais domésticos e do homem (ABREU-SILVA *et al.*, 2008; CAMARGO-NEVES, RODAS, GOMES, 2007; DIAS, LOROSA, REBÊLO, 2003; MISSAWA, LOROSA, DIAS, 2008). No entanto, a espécie *Lutzomyia cruzi* vem sendo apontada como vetora de *L. infantum* no estado de Mato Grosso do Sul, devido à ausência de *Lu. longipalpis* na área urbana do estado, associada à detecção da presença de *Lu. cruzi* infectado por *Leishmania* nessa área (GALATI *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 1998).

As fêmeas flebotomíneas apresentam hábito alimentar eclético e exercem a hematofagia para a maturação de seus ovos, utilizando-se para tanto de uma grande variedade de animais domésticos e sinantrópicos, incluindo principalmente aves, cães e roedores (CAMARGO-NEVES, RODAS, GOMES, 2007; DIAS, LOROSA, REBÊLO, 2003; MISSAWA, LOROSA, DIAS, 2008). O elevado grau de cinofilia apresentado pelo *Lu. longipalpis*, reforça o papel do cão no ciclo da LV (CAMARGO-NEVES, RODAS, GOMES, 2007).

2.5 RESERVATÓRIO VERTEBRADO

A *L. infantum* já foi identificada parasitando animais domésticos e animais sinantrópicos, dentre eles: canídeos domésticos e selvagens, marsupiais e roedores (CARREIRA *et al.*, 2012; CURI, MIRANDA, TALAMONI, 2006; SHERLOCK *et al.*, 1984, 1988; SOUZA *et al.*, 2010). Sherlock (1996), em um estudo realizado no município de Jacobina – Bahia, observou que o número de gambás (*Didelphis*

albiventris) capturados no peridomicílio aumentou nos meses de maior densidade flebotomínea e aparecimento de novos casos de LV. A adaptação de animais silvestres, naturalmente infectados, ao ambiente peridomiciliar representa um elo entre o ciclo silvestre e o ciclo doméstico da doença (HUMBERG *et al.*, 2012). Cabrera e colaboradores (2003), utilizando regressão logística, mostraram que a presença de marsupiais em quintais, aumenta em 2,6 vezes a probabilidade de infecção em cães, que são considerados como o principal reservatório doméstico da *L. infantum* nas áreas urbanas.

Algumas evidências apontam os cães como o principal reservatório urbano da LV, sendo elas: I) presença da LV em 98 países e cerca de 50 desses países possuem casos de LVC (ALVAR, *et al.*, 2004), II) elevado parasitismo cutâneo observado em cães infectados por *Leishmania*, que podem funcionar como fonte de infecção para o vetor (CUNHA, 1938; MOLINA *et al.*, 1994), III) observação de alta prevalência de LV em cães nas áreas endêmicas, sendo esta superior à prevalência de LV humana (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2001; SHERLOCK, 1996; SILVA *et al.*, 2001), IV) relatos de epidemias caninas precedendo temporal e espacialmente o surgimento de casos humanos (BEVILACQUA *et al.*, 2001), V) presença de cães sem sinais clínicos da doença que não são facilmente diagnosticados, mas albergam o parasito na derme, desempenhando um papel na introdução, dispersão e manutenção da doença urbana (MOLINA *et al.*, 1994).

Esses achados da literatura evidenciam que apesar da participação de animais sinantrópicos no ciclo da LV, os cães desempenham um papel importante na epidemiologia da doença no ambiente urbano, sendo, portanto, um dos alvos das estratégias de controle da LV (GONTIJO, MELO, 2004; MAROLI *et al.*, 2010).

2.6 CONTROLE da LV

No Brasil, as estratégias atuais de controle da LV, preconizadas pelo Ministério da Saúde, estão centradas no inquérito sorológico dos cães, com eutanásia dos animais sororreagentes; diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos; controle do vetor com a borrifação das residências, utilizando inseticidas de ação residual; e atividades de educação em saúde (BRASIL, 2006). Essas medidas devem ser realizadas de forma integrada e tem como objetivo reduzir as taxas de

letalidade, o grau de morbidade e os níveis de transmissão da doença (OLIVEIRA, MORAIS, MACHADO-COELHO, 2008).

No entanto, a eficácia das medidas de controle é comprometida, pois essas ações apresentam limitações como: I) baixa sensibilidade dos testes diagnósticos utilizados, mantendo animais infectados no ambiente (CABRERA *et al.*, 2003; LIRA *et al.*, 2006; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001), II) longos intervalos de tempo entre o diagnóstico e a retirada dos cães infectados do ambiente (ASHFORD *et al.*, 1998), III) resistência dos proprietários em relação à remoção de cães sororreagentes (MOREIRA *et al.*, 2004; WERNECK *et al.*, 2014), IV) elevada e imediata reposição da população canina retirada para eutanásia, colocando novos animais susceptíveis no ambiente endêmico (MOREIRA *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2008), V) presença de outros reservatórios nas áreas endêmicas (ASHFORD *et al.*, 1998; LAINSON, 1985), VI) poder residual limitado do inseticida utilizado na borrifação (CAMARGO-NEVES, 2011) e VII) problemas orçamentários e escassez de recursos humanos adequadamente treinados para executar as atividades de controle da LV (GONTIJO, MELO, 2004; OLIVEIRA, MORAIS, MACHADO-COELHO, 2008)

No Brasil, as medidas oficiais de controle da LV não são eficazes na redução do número de casos de leishmaniose (MOREIRA *et al.*, 2004). O avanço da LV para os grandes centros urbanos e a sua expansão geográfica confirmam o fracasso das estratégias de controle, que não foram suficientes para impedir a disseminação da doença (ALVES, BEVILACQUA, 2004; ARIAS, MONTEIRO, ZICKER, 1996; BEVILACQUA *et al.*, 2001; MENDES *et al.*, 2002; PROFETA DA LUZ *et al.*, 2001; WERNECK *et al.*, 2014). As falhas no programa de controle, com a consequente expansão da LV no Brasil, demonstram a necessidade do aprimoramento dos sistemas de vigilância e de controle da doença (GONTIJO, MELO, 2004; WERNECK *et al.*, 2014). As estratégias de controle da LV avançaram pouco nas últimas décadas, mas nos últimos anos novas ferramentas têm sido desenvolvidas com intuito de melhorar o diagnóstico e a prevenção da doença (GRAMICCIA, GRADONI, 2005; MAROLI *et al.*, 2010).

O principal avanço no diagnóstico da LVC no Brasil ocorreu em dezembro de 2011, quando o MS substituiu o ensaio imunoenzimático (EIE® LVC) usado na triagem de cães e a imunofluorescência indireta (IFI® LVC) usada como método de confirmação da doença, por um novo protocolo de diagnóstico sorológico para LVC, utilizando o teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP® LVC) na triagem e o EIE®

LVC como teste confirmatório (BRASIL, 2011). Fraga e colaboradores (2016), compararam a performance dos dois protocolos em um estudo de acurácia diagnóstica, utilizando uma variável de classe latente como padrão-ouro, e encontraram maior especificidade (0,98 vs 0,95), valor preditivo positivo (VPP) (0,83 vs 0,70) e acurácia diagnóstica (0,94 vs 0,92) no protocolo atual, reduzindo resultados falso-positivos. Além disso, a incorporação de um teste rápido no protocolo atual permite acelerar a implementação das medidas de controle em áreas endêmicas, uma vez que o teste não requer equipamento especializado, podendo ser realizado a campo e com o resultado obtido em 15 minutos (SCHUBACH, FIGUEIREDO, ROMERO, 2014; SILVA *et al.*, 2013). No entanto, mais esforços devem ser feitos para melhorar a sensibilidade que ainda é limitada nos dois protocolos, mantendo animais falso-negativos no ambiente, que servem de fonte de infecção para o inseto vetor (FRAGA *et al.*, 2016)

Na prevenção da LVC, os avanços incluem o uso de coleiras impregnadas ou aplicações tópicas de inseticidas em cães de áreas endêmicas (BOURDOISEAU *et al.*, 2009). O uso de inseticidas tópicos ou de coleiras impregnadas protege os cães das picadas de fêmeas de flebotômíneos durante o repasto sanguíneo e interrompe o ciclo de transmissão da *Leishmania* (MAROLI *et al.*, 2010; MIRÓ *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). Atualmente, as preparações à base de piretróides sintéticos são as mais utilizadas, devido a sua eficácia contra os flebotômíneos e baixa toxicidade para o hospedeiro canino (ALEXANDER, MAROLI, 2003; FALCÃO, PINTO, GONTIJO, 1988; FERROGLIO, POGGI, TRISCIUOGLIO, 2007; MIRÓ *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). Os piretróides, além do efeito tóxico, provoca também irritação e desorientação nos flebotômíneos, resultando na diminuição da taxa de alimentação (REITHINGER, TEODORO, DAVIES, 2001).

Reithinger, Teodoro e Davies (2001), em um estudo experimental, que tinha como objetivo comparar o efeito letal e anti-alimentação de inseticidas em diferentes formulações, mostraram que a coleira impregnada com deltametrina a 4% foi a mais eficaz na redução da taxa de sobrevivência e de alimentação do *Lu. intermedia*. A deltametrina é um composto lipofílico que pertence à classe química dos piretróides e tem sido utilizada em cães na forma de coleira de policloreto de polivinila (PVC) impregnada com 40mg/g do inseticida (CAMARGO-NEVES, 2011; SANTOS, AREAS, REYES, 2007). Estudos experimentais utilizando coleiras impregnadas com deltametrina a 4% tem apresentado resultados promissores na proteção individual de

cães contra o vetor flebotomíneo (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1997; REITHINGER, TEODORO, DAVIES, 2001). David e colaboradores, em 2001, mostraram que cães utilizando coleiras com deltametrina, quando sedados e colocados em gaiolas teladas contendo flebotomíneos das espécies *Lu. longipalpis* e *Lu. migonei*, apresentaram proteção contra as picadas dos vetores de até 96% e a taxa de mortalidade dos flebótomos foi superior a 90%. Esses estudos também mostraram que o uso da coleira com deltametrina pode proteger os cães das picadas dos flebotomíneos por até 8 meses, revelando uma ferramenta que pode ser útil no controle da LVC (DAVID *et al.*, 2001; KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1997).

No entanto, os estudos de campo que avaliaram a eficácia da coleira impregnada com deltametrina a 4% no controle da LVC ainda são escassos. Maroli e colaboradores (2001), em um estudo realizado no Sul na Itália, instituíram o uso da coleira com deltametrina em 70% dos cães de uma cidade endêmica para LV, onde o vetor da *Leishmania* é o *Phlebotomus perniciosus*, e apontaram proteção de até 86% contra LVC, em comparação com os cães da cidade controle. Um estudo similar foi realizado por Gavgani *et al.* (2002) em uma região endêmica do Irã, onde o *Phlebotomus kandelaki* é incriminado como vetor da *Leishmania*, e foi observado que a taxa de soroconversão em cães utilizando a coleira com deltametrina reduziu 54%, em comparação com os cães sem a coleira. Em 2006, Foglia Manzillo *et al.* também notaram que a coleira com deltametrina conferiu uma proteção de 50,8% contra LVC em cães errantes de uma área endêmica da Itália que receberam as coleiras e foram confinados em um canil junto com cães infectados por *Leishmania*. Contudo, a transmissão da *Leishmania* nas áreas estudadas não ocorre o ano todo, devido a dinâmica sazonal dos vetores, diferente do que acontece no Brasil, onde a transmissão da *L. infantum* pelo *Lu. longipalpis* é contínua (REBÊLO, 2001).

Reithinger e colaboradores (2004), utilizaram um modelo matemático para avaliar o impacto epidemiológico da aplicação de coleiras impregnadas com deltametrina como medida de controle da LVC em áreas endêmicas do Brasil e estimaram que, em locais onde a taxa de transmissão é elevada, o uso das coleiras reduz o risco de infecção por *L. infantum* nos cães e é mais eficaz do que a eutanásia de cães soropositivos. A eficácia do uso da coleira com deltametrina como medida de controle no cenário brasileiro também foi avaliada por Camargo-Neves (2011), em um estudo de série temporal, onde cães com sorologia negativa na RIFI em eluato de sangue receberam a coleira, que foi trocada a cada 6 meses, durante 3 anos, e os

cães soropositivos foram eutanasiados. Camargo-Neves, notou uma redução significativa na taxa de incidência da LVC, contudo, no desenho do estudo não havia uma área controle para comparação dos achados e para o cálculo da taxa de prevenção. Adicionalmente, o teste sorológico utilizado no diagnóstico dos cães mostrou ter baixa especificidade, encaminhando cães falso-positivos para eutanásia e superestimando a prevalência da LVC.

Diante disso, novos estudos que selecionem uma área controle e utilizem testes sorológicos para LVC mais específicos precisam ser conduzidos em áreas endêmicas do Brasil, para avaliar melhor a eficácia da coleira impregnada com deltametrina na interrupção do ciclo de transmissão doméstico e a sua contribuição como medida de controle da LV.

3 HIPÓTESE

A coleira impregnada com deltametrina a 4%, quando usada como medida de controle, é eficaz na redução das taxas de incidência de LVC em áreas endêmicas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em cães, no controle e prevenção da LVC em uma área endêmica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a soroprevalência da LVC em uma área endêmica para LV;
- Determinar a incidência da LVC nessa área endêmica;
- Avaliar a eficácia da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% na redução da incidência dos casos de LVC.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ÁREA DO ESTUDO

A realização do trabalho de campo foi solicitada pelo Ministério da Saúde à equipe do Laboratório de Patologia e Biointervenção do Instituto Gonçalo Moniz (LPBI – IGM – FIOCRUZ – BA) no intuito de avaliar a eficácia da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em cães, no controle e prevenção da LVC em áreas endêmicas. Assim, um estudo longitudinal foi realizado na localidade de Monte Gordo, distrito do município de Camaçari - Bahia, área endêmica para LV e LVC, situado na latitude 12°41'51" e longitude 38°19'27". O município de Camaçari está localizado na Região Metropolitana de Salvador (RMS), a 41 km da capital, e abrange uma área de 784,7 Km², com população estimada de 242.970 habitantes (IBGE, 2010). O município apresenta clima tropical úmido, com período chuvoso entre os meses de abril e junho, precipitação pluviométrica média anual superior a 1.600 mm e temperatura média anual de 25,4°C (URBAM - <http://www.sig.camacari.ba.gov.br/>). O distrito de Monte Gordo, situado na zona litorânea de Camaçari, possui população estimada em 29.573 habitantes e 8.962 domicílios (IBGE, 2010).

Em um estudo de corte transversal realizado anteriormente por uma equipe do LPBI – IGM – FIOCRUZ – BA, para avaliação da prevalência de LVC no município de Camaçari, uma amostra randomizada de 40 cães residentes em Monte Gordo apresentou prevalência de LVC de 57,5% (dados não publicados).

5.2 DESENHO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS

O distrito de Monte Gordo foi dividido em duas áreas, com auxílio de croquis que foram fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Camaçari, sendo: I) uma área intervenção, onde os cães soronegativos para LVC receberam a coleira impregnada com deltametrina a 4% e II) uma área controle, onde os cães soronegativos para LVC não receberam a coleira (figura 2). A população canina na área intervenção era de 933 cães e na área controle era de 556 cães.

A área intervenção e a área controle eram semelhantes em relação as características ambientais. Nas duas áreas, apesar de serem urbanas, havia presença

de vegetação nativa e criação de outros animais domésticos no peridomicílio das residências, como galinhas e cavalos.



Figura 2 – Localidade de Monte Gordo dividida em área intervenção e área controle

Todas as residências das duas áreas foram visitadas, os proprietários que estavam presentes no momento da visita foram esclarecidos quanto ao estudo e os cães daqueles que concordavam em participar foram identificados pelo preenchimento de uma ficha, contendo dados do animal, como nome, sexo, idade e porte, e dados do proprietário, como nome, endereço e telefone para contato. Em seguida, os animais foram avaliados sorologicamente, seguindo o novo protocolo preconizado pelo MS para o diagnóstico da LVC (TR-DPP® LVC e EIE® LVC Bio-Manguinhos).

Os cães com sorologia negativa para LVC e residentes na área intervenção, receberam coleiras impregnadas com deltametrina a 4% e essas coleiras foram trocadas a cada 7 ou 8 meses. No período do estudo, foram efetuadas três avaliações sorológicas e duas trocas de coleiras, para os cães que permaneceram sorologicamente negativos nos momentos das trocas. Os proprietários dos cães foram orientados a notificar qualquer sinal que pudesse sugerir um quadro de reação alérgica à coleira. Nestes casos, os cães foram visitados por um médico veterinário e foi aconselhada a retirada da coleira, caso o animal apresentasse qualquer sinal de hipersensibilidade.

Na área controle, os cães com sorologia negativa para LVC, foram avaliados novamente a cada 7 ou 8 meses, mas não utilizaram as coleiras impregnadas com

deltametrina a 4%. No período do estudo, foram efetuadas três avaliações sorológicas.

Durante as três avaliações sorológicas, os resultados dos testes sorológicos dos cães foram repassados para os médicos veterinários responsáveis pelo Programa de Controle das Leishmanioses no CCZ de Camaçari e os cães que tinham sorologia positiva para LVC foram recolhidos para eutanásia, como preconizado pelo MS.

Em cada avaliação sorológica, todas as residências das duas áreas foram visitadas novamente e os cães que não tinham sido avaliados na visita anterior, foram incluídos no estudo.

5.3 COLETA DE AMOSTRA E DIAGNÓSTICO DA LVC

Os cães domiciliados e semi-domiciliados que foram incluídos no estudo, residentes na área intervenção ou na área controle, foram submetidos ao atual protocolo sorológico preconizado pelo MS para diagnóstico da LVC.

Os animais foram avaliados primeiramente pelo teste rápido, TR-DPP® LVC Bio-Manguinhos (Figura 3), seguindo as recomendações do fabricante. Durante a visita aos domicílios, foi coletada uma gota de sangue da ponta da orelha do animal para a realização do teste e a leitura do resultado foi feita em 15 minutos, na residência do proprietário.

Os cães da área intervenção que apresentaram resultado negativo no TR-DPP® LVC, receberam a coleira impregnada com deltametrina a 4% e foram avaliados novamente a cada 7 ou 8 meses. Os cães da área controle que apresentaram resultado negativo no TR-DPP® LVC, não receberam a coleira, mas também foram avaliados novamente a cada 7 ou 8 meses.

Os cães das duas áreas do estudo que apresentaram resultado positivo no TR-DPP® LVC foram submetidos à coleta de sangue venoso para confirmação do diagnóstico da LVC por EIE® LVC Bio-Manguinhos. Os ELISAs foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN-BA), seguindo as especificações do fabricante.

A coleta de sangue venoso dos animais com resultado positivo no TR-DPP® LVC foi realizada por punção da veia cefálica, tibial ou jugular, em um volume máximo de 5 ml, que foi acondicionado em tubos com acelerador de coagulação até a chegada ao laboratório. No LPBI – IGM – FIOCRUZ – BA, o soro foi separado do coágulo

sanguíneo e as alíquotas de soro foram identificadas e encaminhadas ao LACEN-BA para a realização do EIE® LVC Bio-Manguinhos.

Os cães das duas áreas com o diagnóstico de LVC confirmado pelo EIE® LVC, foram recolhidos para eutanásia pelo CCZ de Camaçari. Os cães da área intervenção com diagnóstico negativo no EIE® LVC, foram visitados novamente e receberam a coleira impregnada com deltametrina a 4%, sendo reavaliados novamente a cada 7 ou 8 meses, enquanto os cães da área controle com diagnóstico negativo no EIE® LVC foram avaliados novamente a cada 7 ou 8 meses, mas não receberam a coleira.

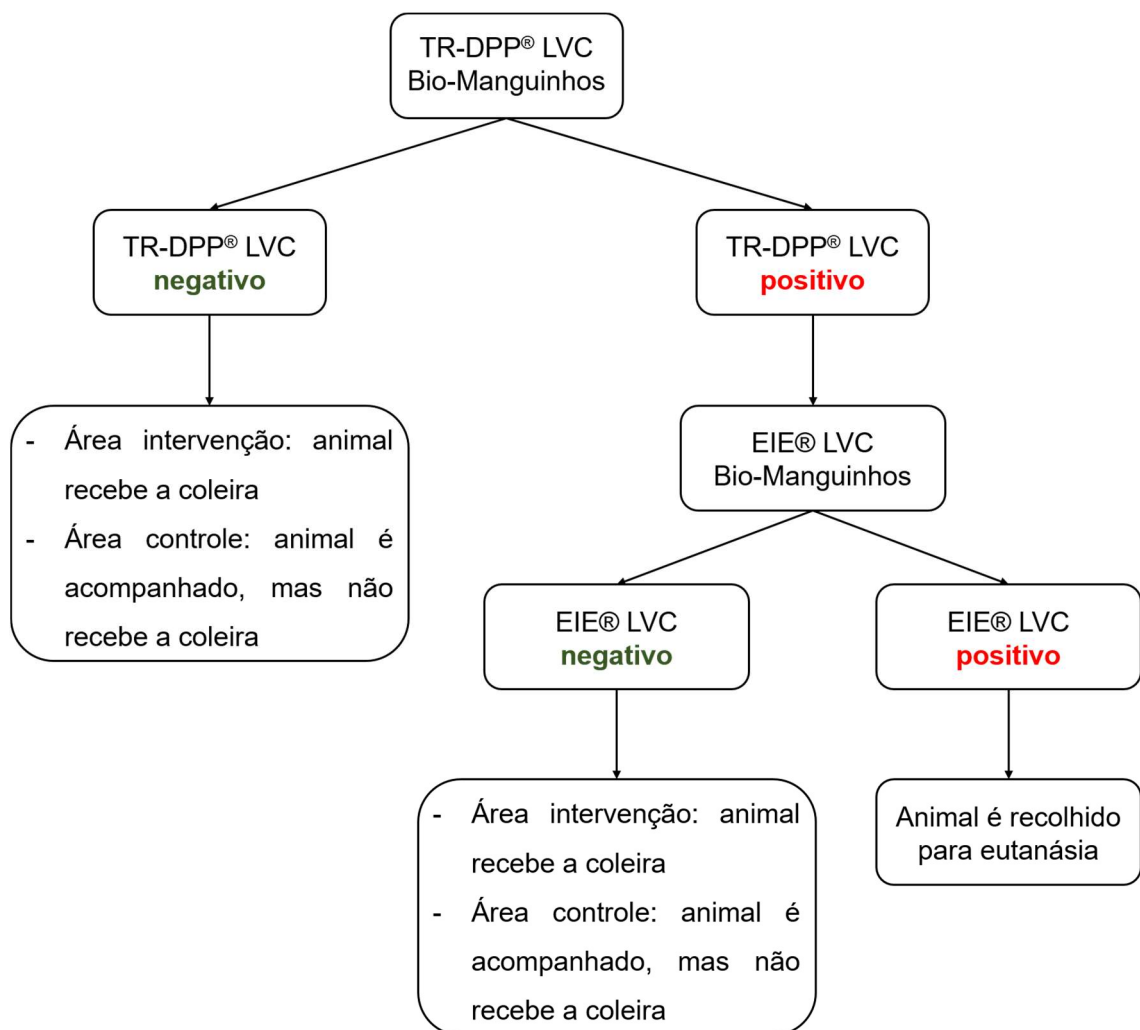


Figura 3 – Fluxograma da avaliação sorológica dos cães incluídos no estudo

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Bancos de dados, compreendendo as informações obtidas nas fichas de identificação dos animais e os resultados diagnósticos, foram construídos no programa doFormsTM4.1.1 e analisados utilizando o programa EPI INFOTM7 e o programa STATA[®]12.

As taxas de soroprevalência da LVC foram avaliadas na área intervenção e na área controle, nos três inquéritos sorológicos da coorte canina. Para o cálculo da soroprevalência, a coorte canina foi considerada aberta, considerando as perdas de segmento e os novos cães incluídos a cada inquérito.

As taxas de incidência da LVC no segundo e no terceiro inquérito também foram avaliadas nas duas áreas do estudo. Para o cálculo da incidência, a coorte canina foi considerada fechada, acompanhando apenas os cães com sorologia negativa no primeiro inquérito sorológico, sem inclusão de novos cães ao longo do estudo.

A comparação da soroprevalência e da taxa de incidência entre a área intervenção e a área controle foi realizada pelo teste do qui-quadrado (X^2) e pela razão de risco (RR), e foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

Em seguida, foi realizada a análise de sobrevivência no programa STATA[®]12, com o propósito de determinar comparativamente o tempo entre a primeira avaliação do animal e a ocorrência de soroconversão nas duas áreas do estudo. Na análise de sobrevivência foram apenas considerados os animais com sorologia negativa para LVC no primeiro inquérito e os animais soronegativos incluídos no segundo inquérito sorológico. Os desfechos possíveis foram soroconversão ou não. Os casos que tiveram outro desfecho, como morte do animal ou mudança de endereço, e aqueles em que o tempo até a soroconversão foi superior ao período do estudo, foram censurados. O método não paramétrico de Kaplan-Meier foi utilizado para calcular o tempo de sobrevida nas áreas de estudo e construir as curvas de sobrevivência. O teste de Wilcoxon foi utilizado para testar se houve diferença no tempo de sobrevida entre as áreas. A razão de risco (RR) para o uso da coleira com deltametrina foi calculada, na análise de sobrevivência, pelo modelo de Cox, com intervalo de confiança de 95%. Em todas as análises, a diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $p \leq 0,05$.

5.5 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado (Protocolo nº 29/2013) no Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). A eutanásia dos cães soropositivos para LVC foram realizadas no CCZ de Camaçari, Bahia. Todos os procedimentos seguiram as normas técnicas estabelecidas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (Resolução CFMV nº 714/2002).

Todos os proprietários que concordaram em participar do estudo assinaram voluntariamente um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

6 RESULTADOS

6.1 DINÂMICA DO ESTUDO EXPERIMENTAL

O primeiro inquérito sorológico (*baseline*) ocorreu entre janeiro de 2014 e maio de 2014 na área intervenção e entre maio de 2014 e outubro de 2014 na área controle. Nesse período foram incluídos no estudo cães residentes em 495 domicílios da área intervenção e 319 domicílios da área controle. Na área intervenção foram avaliados inicialmente 852 cães domiciliados e semi-domiciliados e na área controle foram avaliados 513 cães.

Na avaliação sorológica dos cães da área intervenção, 68,5% (584/852) dos cães avaliados no primeiro inquérito apresentaram resultado negativo para LVC no TR-DPP® LVC Bio-Manguinhos e receberam a coleira impregnada com deltametrina a 4%. No entanto, 31,5% (268/852) dos cães apresentaram resultado positivo no teste rápido e foram submetidos à coleta de sangue venoso para confirmação do diagnóstico por EIE® LVC Bio-Manguinhos. O ELISA confirmou a positividade em 19,1% (163/852) dos animais avaliados nessa área e esses foram notificados ao CCZ de Camaçari para serem recolhidos e eutanasiados, como preconizado pelo MS. Os cães negativos no EIE® LVC foram visitados novamente e receberam a coleira impregnada com deltametrina.

Na área controle, entre os cães avaliados no primeiro inquérito, 81,9% (420/513) apresentaram resultado negativo no DPP e foram incluídos no estudo para serem avaliados novamente nos inquéritos seguintes. Em contrapartida, 18,1% (93/513) dos cães apresentaram resultado reagente no teste rápido, e assim como foi feito na área intervenção, esses animais foram testados no EIE® LVC Bio-Manguinhos. A positividade foi confirmada em 11,1% (57/513) dos cães avaliados nessa área. Os cães negativos no ELISA também foram incluídos no estudo.

No entanto, após a primeira avaliação sorológica dos cães (*baseline*) foram observados problemas operacionais, como a dificuldade no transporte da equipe até a área do estudo e a greve dos funcionários do CCZ de Camaçari. Esses problemas atrasaram as atividades de campo e dificultaram a realização do segundo e do terceiro inquéritos sorológicos nas áreas de estudo, além de obstar a troca de coleira nos cães da área intervenção. Assim, optou-se por reduzir as áreas do estudo, com a

consequente redução do número de animais a serem avaliados ao longo do estudo (figura 4).

Os recortes foram realizados com base na avaliação dos croquis e na soroprevalência da LVC na primeira avaliação sorológica (*baseline*), de forma que as áreas intervenção e controle se mantivessem comparáveis em relação a prevalência da doença. Assim, na primeira avaliação (*baseline*) considerando apenas as áreas após o recorte, o número de cães incluídos foi de 404 na área intervenção e 119 na área controle, apresentando prevalências de 26% (105/404) e 31,9% (38/119), respectivamente.

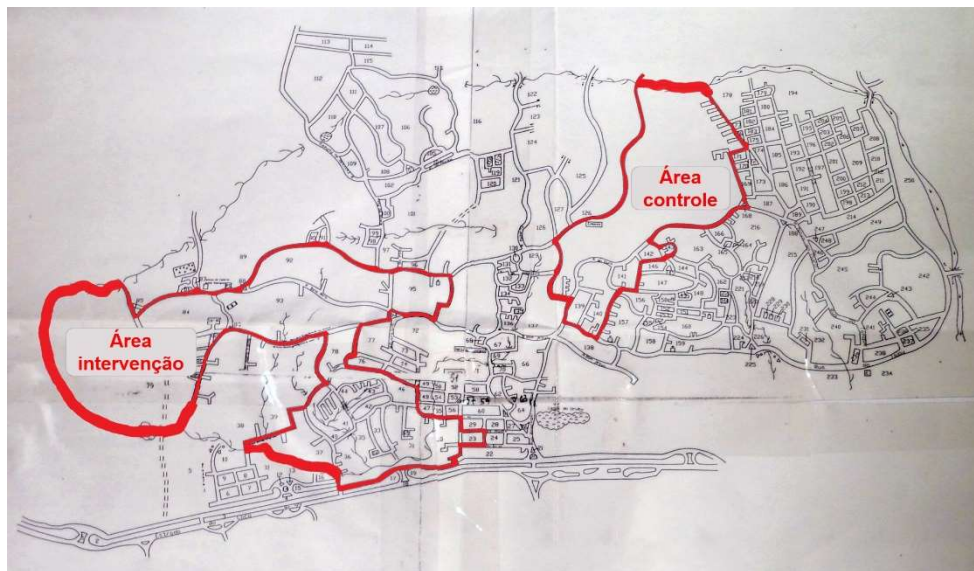


Figura 4 – Localidade de Monte Gordo dividida em área intervenção e área controle após o recorte. Recortes realizados nas áreas de estudo após o primeiro inquérito sorológico (*baseline*), com o objetivo de reduzir o número de animais a serem avaliados. Os recortes foram realizados mantendo uma prevalência comparável de LVC com base na primeira avaliação sorológica.

6.2 DINÂMICA DO ESTUDO EXPERIMENTAL APÓS O RECORTE DAS ÁREAS DE ESTUDO

O acompanhamento dos animais nas áreas recortadas ocorreu entre janeiro de 2014 e novembro de 2015, quando foram realizados três inquéritos sorológicos nas duas áreas, com uma média de 8 meses de intervalo entre os inquéritos. Nesse período foram incluídos no estudo cães residentes em 349 domicílios da área intervenção e 146 da área controle. A tabela 1 mostra os períodos de realização dos inquéritos sorológicos nas duas áreas do estudo. O primeiro inquérito sorológico

(*baseline*) na área intervenção foi entre janeiro/2014 e abril/2014 e na área controle ocorreu entre os meses de maio/2014 e julho/2014.

Tabela 1 – Períodos de realização dos inquéritos sorológicos nas áreas de estudo na localidade de Monte Gordo - Camaçari

	1º inquérito sorológico	2º inquérito sorológico	3º inquérito sorológico
Área intervenção	janeiro/2014 a abril/2014	agosto/2014 a março/2015	abril/2015 a setembro/2015
Área controle	maio/2014 a julho/2014	março/2015 a maio/2015	setembro/2015 a novembro/2015

Os dados descritivos dos animais avaliados durante o primeiro inquérito (*baseline*) estão na tabela 2. A distribuição de idade, raça, porte e sexo dos animais não mostrou diferenças estatisticamente significantes nas duas áreas do estudo, apesar do percentual de machos na área intervenção (55,7%) ter sido maior do que o encontrado na área controle (47,9%).

Em relação a avaliação sorológica dos cães durante o primeiro inquérito, 65,6% (265/404) dos animais avaliados na área intervenção foram negativos para LVC no TR-DPP® LVC Bio-Manguinhos e receberam a coleira impregnada com deltametrina a 4%. Em contrapartida, 34,4% (139/404) dos cães apresentaram resultado positivos no teste rápido e foram submetidos à coleta de sangue venoso para confirmação do diagnóstico por EIE® LVC Bio-Manguinhos. O ELISA confirmou a positividade de 26% (105/404) dos animais avaliados e esses foram notificados ao CCZ de Camaçari. Os cães negativos no EIE® LVC foram visitados novamente e receberam a coleira impregnada com deltametrina.

Na área controle, 61,3% (73/119) dos cães avaliados no primeiro inquérito sorológico foram negativos no teste rápido para LVC e incluídos no estudo para serem avaliados novamente nos inquéritos seguintes. No entanto, 38,7% (46/119) dos cães apresentaram resultado reagente no TR-DPP® LVC e foram testados no EIE® LVC Bio-Manguinhos, assim como ocorreu na área intervenção, e a positividade foi confirmada em 31,9% (38/119) dos animais avaliados. Os cães negativos no ELISA também foram incluídos no estudo de seguimento.

Tabela 2: Caracterização dos cães avaliados no primeiro inquérito sorológico (*baseline*) das áreas de estudo na localidade de Monte Gordo - Camaçari

Características dos cães	Área intervenção n/N (%)	Área controle n/N (%)	p-valor
Sexo			
Macho	225/404 (55,7%)	57/119 (47,9%)	0,16316650
Fêmea	179/404 (44,3%)	62/119 (52,1%)	
Idade			
Filhote (0-1 anos)	90/388 (23,2%)	22/116 (19%)	0,76069
Jovem (1-2 anos)	118/388 (30,4%)	42/116 (36,2%)	
Adulto Jovem (3-4 anos)	82/388 (21,1%)	26/116 (22,4%)	
Adulto (4-7 anos)	62/388 (16%)	19/116 (16,4%)	
Idoso (> 7 anos)	36/388 (9,3%)	7/116 (6%)	
Raça			
Mestiço	306/386 (79,3%)	98/115 (85,2%)	0,20009629
Puro	80/386 (20,7%)	17/115 (14,8%)	
Porte			
Toy (0,1-3 kg)	12/398 (3,0%)	3/116 (2,6%)	0,95701
Pequeno (4-10 kg)	173/398 (43,5%)	50/116 (43,1%)	
Médio (11-20 kg)	171/398 (43%)	53/116 (45,7%)	
Grande (21-40 kg)	41/398 (10,3%)	10/116 (8,6%)	
Gigante (>40 kg)	1/398 (0,2%)	0/116 (0%)	

6.3 Dinâmica do estudo experimental de coorte canina aberta

No segundo inquérito, a avaliação sorológica foi realizada em 167 novos cães na área intervenção e repetida em apenas 44,5% (133/299) dos animais que tinham sido negativos no primeiro inquérito, devido a elevada perda de segmento. Na área controle, foram avaliados 96 novos cães e os exames foram repetidos em 43,2%

(35/81) dos animais que tinham resultados negativos anteriormente. Assim, no segundo inquérito foram avaliados 300 animais na área intervenção e 131 na área controle. O número de cães avaliados e o número de perdas de segmento em cada inquérito sorológico é mostrado nas tabelas 3 e 4, respectivamente. A distribuição de idade, raça, porte e sexo dos animais perdidos ao longo do acompanhamento não mostrou diferenças estatisticamente significativas nas duas áreas do estudo.

Na avaliação sorológica realizada durante o segundo inquérito, 82,3% (247/300) dos cães examinados na área intervenção apresentaram resultado negativo no teste rápido para LVC e receberam a coleira impregnada com deltametrina. Em contrapartida, 17,3% (53/300) dos cães apresentaram resultado positivo no TR-DPP[®] LVC e foram testados no ELISA. A LVC foi confirmada em 8,3% (25/300) dos animais avaliados e a coleira com deltametrina também foi colocada nos 28 cães com resultado negativo no EIE[®] LVC.

Na área controle, o TR-DPP[®] LVC foi negativo para 88,5% (116/131) dos cães avaliados no segundo inquérito. No entanto, 11,5% (15/131) dos cães apresentaram resultado suspeitos de LVC no teste rápido e 7,6% (10/131) foram confirmados no EIE[®] LVC.

No terceiro e último inquérito sorológico foram avaliados 378 cães na área intervenção, sendo que destes 155 foram de novas inclusões, e 193 cães na área controle, com 106 destes sendo de novos animais incluídos no estudo (tabela 3). Na área intervenção, 84,7% (320/378) dos cães avaliados pelo TR-DPP[®] LVC apresentaram resultado negativo e receberam a coleira com deltametrina. Contudo, 15,3% (58/378) dos cães apresentaram resultado positivo no teste rápido e foram testados no EIE[®] LVC. A doença foi confirmada em 6,3% (24/378) dos animais avaliados. A coleira com deltametrina foi colocada nos 34 cães com resultado negativo no ELISA.

Na área controle, 80,8% (156/193) dos cães tiveram resultado negativo no TR-DPP[®] LVC no último inquérito sorológico. Entretanto, 19,2% (37/193) dos cães avaliados foram reagentes no DPP e 11,4% (22/193) tiveram o diagnóstico de LVC confirmado pelo ELISA.

As figuras 5 e 6 sintetizam a dinâmica do estudo experimental de coorte aberta nos três inquéritos sorológicos realizados durante a execução do projeto, na área intervenção e na área controle, respectivamente.

Tabela 3: Número de cães avaliados segundo a área de estudo e o momento da avaliação. Monte Gordo - Camaçari

Área	Número de cães avaliados	1º inquérito	2º inquérito	3º inquérito
Intervenção	Antigos reavaliados	---	133 (44,3%)	223 (59%)
	Novos incluídos	404	167 (55,7%)	155 (41%)
	Total	404	300	378
Controle	Antigos reavaliados	---	35 (26,7%)	87 (45,1%)
	Novos incluídos	119	96 (73,3%)	106 (54,9%)
	Total	119	131	193

Tabela 4: Perda de seguimento de cães durante o estudo longitudinal, segundo o motivo da perda, a área de estudo e o momento da avaliação em Monte Gordo – Camaçari

Motivo da perda	Área intervenção		Área controle	
	Entre o 1º e o 2º inquérito	Entre o 2º e o 3º inquérito	Entre o 1º e o 2º inquérito	Entre o 2º e o 3º inquérito
Animais positivos com indicação de eutanásia	105 (38,7%)	25 (20,2%)	38 (45,2%)	10 (16,7%)
Animais que apresentaram reações alérgicas a coleira com deltametrina	1 (0,4%)	2 (1,6%)	---	---
Animais doados / vendidos / abandonados na rua	10 (3,7%)	15 (12,1%)	2 (2,4%)	4 (6,7%)
Animais fugiram / sumiram / foram roubados	9 (3,3%)	4 (3,2%)	0	2 (3,3%)
Animais morreram / foram recolhidos pelo CCZ	31 (11,4%)	29 (23,4%)	7 (8,3%)	6 (10,0%)
Animais mudaram de endereço	3 (1,1%)	5 (4,0%)	0	3 (5,0%)
Não foi possível contato com os proprietários ⁽¹⁾	106 (39,1%)	43 (34,7%)	35 (41,7%)	0
Recusa dos proprietários	6 (2,2%)	1 (0,8%)	2 (2,4%)	35 (58,3%)
Total de animais perdidos ⁽²⁾	271	124	84	60

⁽¹⁾ 47 cães que tinham sido perdidos entre o primeiro e o segundo inquérito na área intervenção e 16 cães perdidos na área controle, foram avaliados novamente no terceiro inquérito

⁽²⁾ Não houve diferença estatisticamente significativa no total de animais perdidos entre as áreas do estudo ($p=0,5$ nos dois momentos)

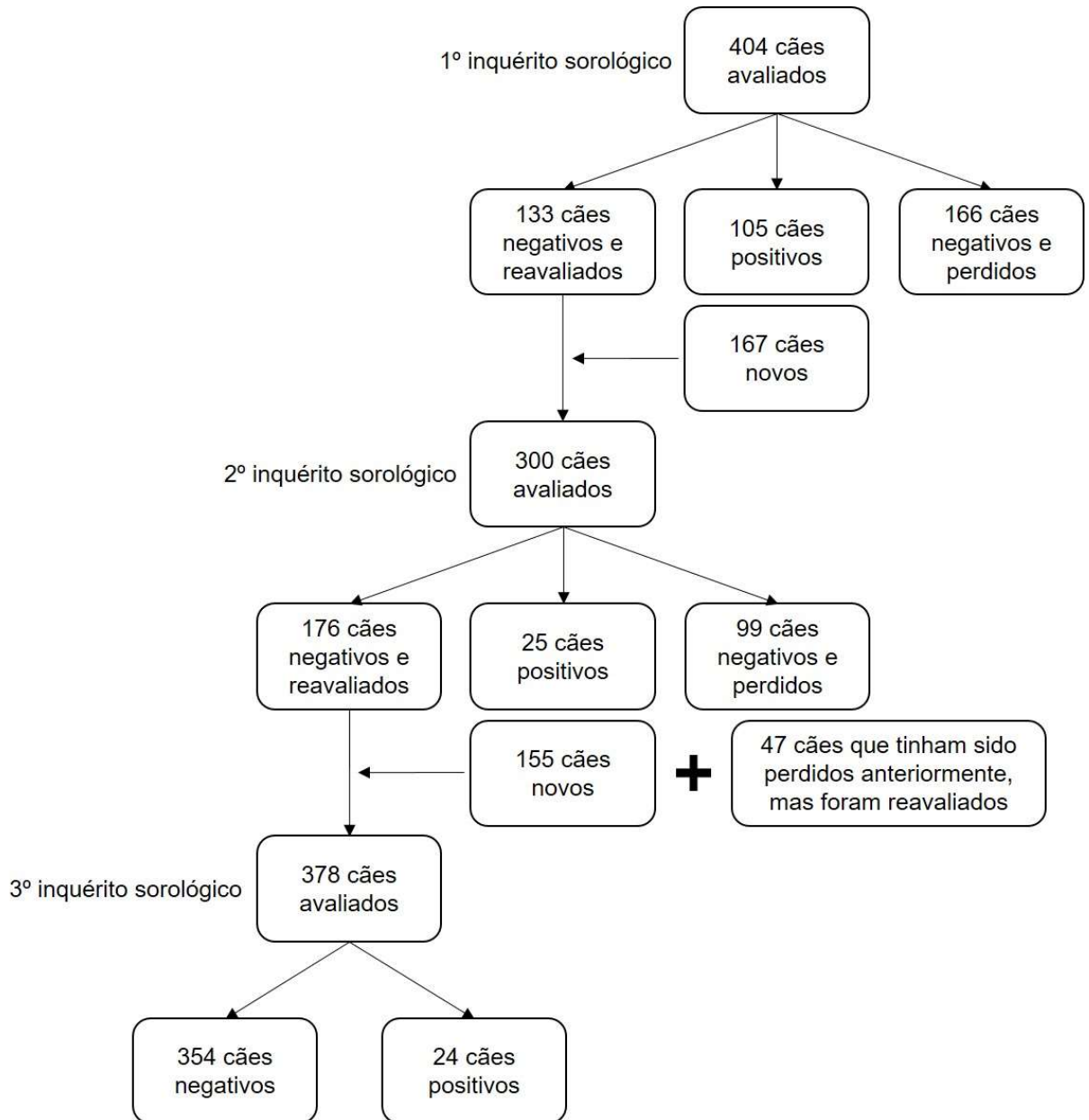


Figura 5: Fluxograma das avaliações sorológicas realizados nos cães incluídos no estudo de coorte aberta da área intervenção em Monte Gordo – Camaçari

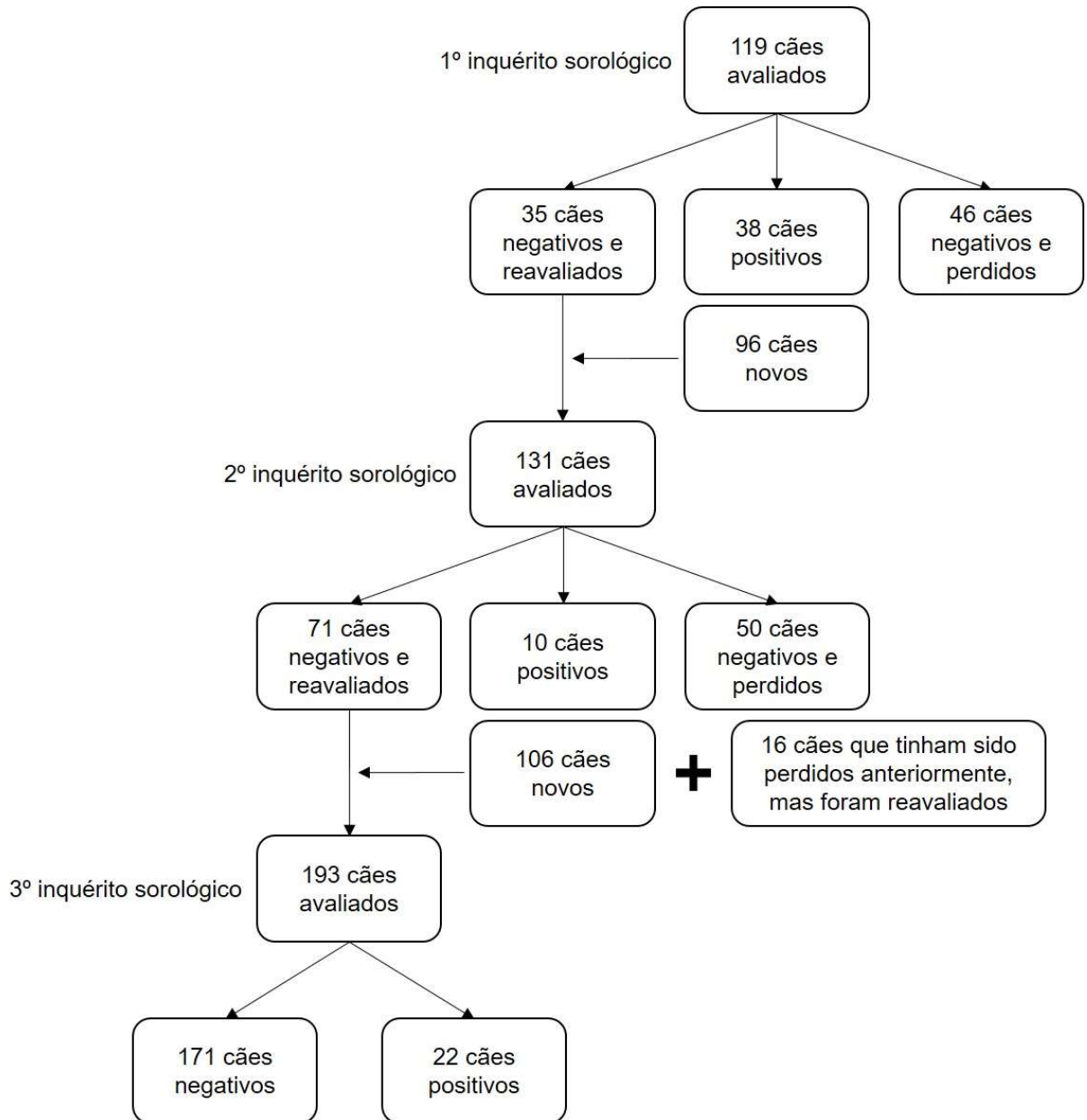


Figura 6: Fluxograma das avaliações sorológicas realizadas nos cães incluídos no estudo de coorte aberta da área controle em Monte Gordo – Camaçari

6.4 AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA NO USO DA COLEIRA IMPREGNADA COM DELTAMETRINA A 4%

Ao longo do estudo foram utilizadas 928 coleiras impregnadas com deltametrina em cães com sorologia negativa, sendo 299 utilizadas no primeiro inquérito, 275 no segundo inquérito e 354 no terceiro inquérito.

Os cães receberam de uma a três coleiras, de acordo com o seu tempo de permanência no estudo. No entanto, o número de perda de coleiras foi elevado e

menos de 42% dos cães que repetiram a avaliação sorológica no inquérito seguinte permaneceram com a coleira no pescoço até o momento da troca (tabela 5).

No primeiro inquérito, um animal apresentou reação alérgica a coleira e o proprietário optou por tirar o animal do estudo. No inquérito seguinte, dois cães do mesmo proprietário também apresentaram sinais de reação alérgica e foram retirados no estudo. No terceiro inquérito, seis cães que tinham sido avaliados anteriormente, estavam sem coleira porque apresentaram sinais de reação alérgica, porém os proprietários concordaram em avaliar novamente os animais, sem utilizar a coleira.

Tabela 5: Número de cães da área intervenção que permaneceram com a coleira no pescoço até a sua troca, segundo o momento da avaliação sorológica. Monte Gordo - Camaçari

Momento da avaliação		N (%)
Primeiro inquérito	Cães que receberam a coleira	299
	Cães que foram avaliados no inquérito seguinte	133 (44,5%)
	Cães que permaneceram com a coleira até a troca	47 (35,3%)
Segundo inquérito	Cães que receberam a coleira	275
	Cães que foram avaliados no inquérito seguinte	176 (64,0%)
	Cães que permaneceram com a coleira até a troca	73 (41,5%)

6.5 TAXA DE SOROPREVALÊNCIA NA COORTE CANINA ABERTA

A soroprevalência de LVC nos animais avaliados no primeiro inquérito foi maior numericamente na área controle, entretanto não houve diferença estatística entre as duas áreas do estudo (tabela 6).

No segundo inquérito sorológico, após a introdução das medidas de controle, houve uma redução significativa na soroprevalência nas duas áreas. Contudo, quando

foi comparada entre as áreas do estudo, a diferença entre as soroprevalências não foi estatisticamente significativa.

No terceiro inquérito, houve redução da soroprevalência na área intervenção e aumento na área controle. Assim, a soroprevalência foi significativamente maior na área controle e a razão de risco calculada sugeriu eficácia na proteção contra LVC de 45%, em decorrência do uso da coleira impregnada com deltametrina entre os cães da área intervenção.

Tabela 6: Taxa de soroprevalência da LVC segundo a área de estudo e o momento da avaliação sorológica. Monte Gordo - Camaçari

Momento da avaliação		Área intervenção	Área controle	Análise comparativa
Primeiro inquérito (<i>baseline</i>)	Cães avaliados	404	119	RR=0,8139
	Cães positivos	105	38	IC: 0,60 - 1,11
	Soroprevalência (%)	26,0 ^(a)	31,9 ^(b)	$p=0,24551615$
Segundo inquérito	Cães avaliados	300	131	RR=1,0917
	Cães positivos	25	10	IC: 0,54 - 2,20
	Soroprevalência (%)	8,3 ^(a)	7,6 ^(b)	$p=0,95779003$
Terceiro inquérito	Cães avaliados	378	193	RR=0,5570
	Cães positivos	24	22	IC: 0,32 - 0,97
	Soroprevalência (%)	6,3	11,4	$p=0,05302243$

^(a) e ^(b) Análise comparativa dentro a mesma área de estudo, entre o primeiro e o segundo inquérito:

^(a) RR=3,1188 (IC=2,07 – 4,70; $p=0,00000000$)

^(b) RR=4,1832 (IC=2,18 – 8,02; $p=0,00000247$)

6.6 DINÂMICA DO ESTUDO EXPERIMENTAL DE COORTE CANINA FECHADA

No intuito de determinar e comparar a incidência da LVC nas áreas estudadas, foram selecionados entre os cães incluídos no estudo apenas aqueles avaliados sistematicamente desde o primeiro inquérito sorológico, sem a inclusão de novos cães nos inquéritos seguintes ou retorno de cães que haviam sido perdidos, mas que

havia sido avaliados anteriormente (figura 7 e 8). Desta forma, dentre os 404 cães avaliados inicialmente na área intervenção e os 119 cães na área controle, foram acompanhados ao longo do estudo os animais que apresentaram sorologia negativa para LVC, que foram respectivamente 299 cães na área intervenção e 81 na área controle.

Na área intervenção, no segundo inquérito a avaliação sorológica foi repetida em apenas 44,5% (133/299) dos cães incluídos no estudo longitudinal. Entre os cães avaliados no segundo inquérito, 93,2% (124/133) apresentaram resultado negativo nos testes sorológicos e receberam a coleira com deltametrina, e 6,8% (9/133) apresentaram resultado positivo e foram notificados ao CCZ. No terceiro inquérito, a avaliação sorológica foi repetida em 87 cães, sendo 97,7% (85/87) soronegativo e 2,3% (2/87) com sorologia positiva para LVC.

Na área controle, no segundo inquérito a avaliação sorológica foi repetida em apenas 43,2% (35/81) dos cães incluídos no acompanhamento. Entre os cães avaliados no segundo inquérito, nenhum apresentou sorologia positiva. No terceiro inquérito, 22 cães foram avaliados, sendo 95,5% (21/22) soronegativo e 4,5% (1/22) soropositivo para LVC.

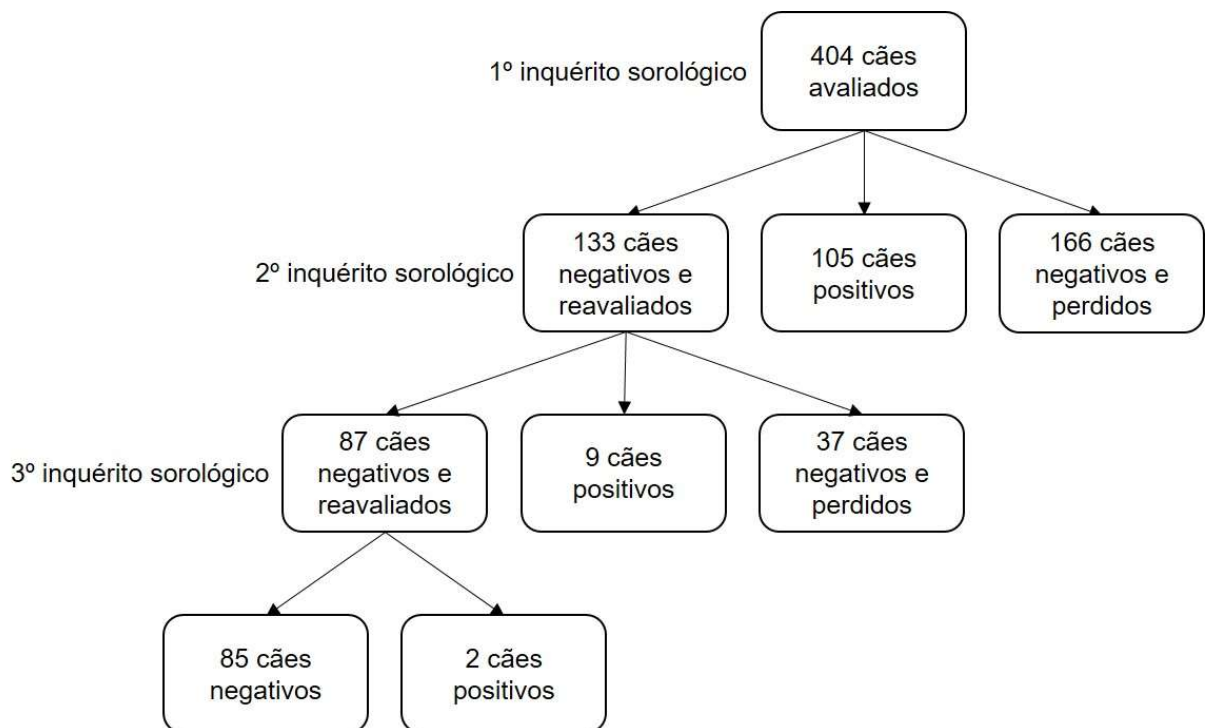


Figura 7: Fluxograma das avaliações sorológicas realizados nos cães incluídos no estudo experimental de coorte fechada da área intervenção em Monte Gordo – Camaçari

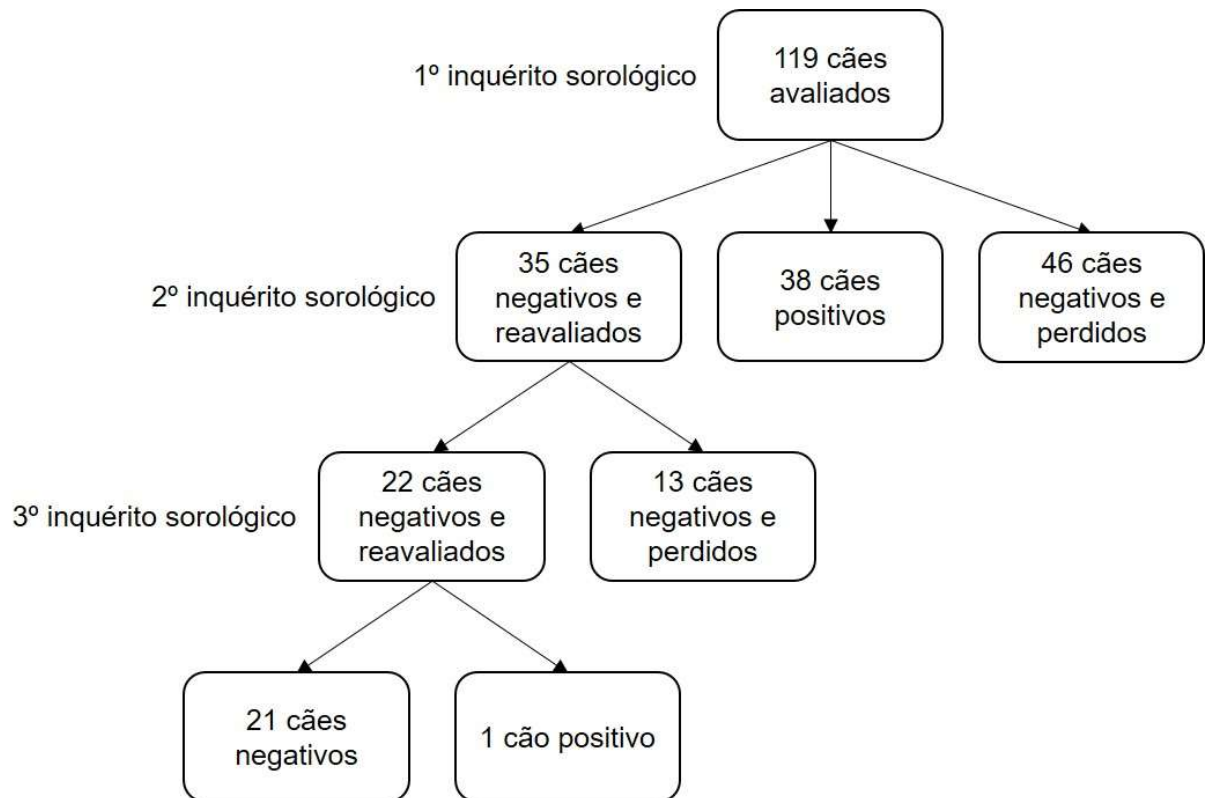


Figura 8: Fluxograma das avaliações sorológicas realizadas nos cães incluídos no estudo experimental de coorte fechada da área controle em Monte Gordo – Camaçari

Em relação a incidência da LVC avaliada na coorte canina fechada, houve redução da taxa na área intervenção entre o segundo e o terceiro inquérito, enquanto que na área controle houve aumento da incidência. A taxa de eficácia da coleira contra a LVC foi de 49% entre os cães da área intervenção (tabela 7). No entanto, não houve qualquer alteração estatisticamente significativa na incidência da LVC ao longo do estudo.

A taxa de incidência também foi calculada e avaliada de forma estratificada entre os cães da área intervenção que permaneceram com a coleira entre os inquéritos sorológicos e aqueles que perderam a coleira. Contudo, não foi observada qualquer alteração estatisticamente significativa entre os dois grupos ao longo do estudo.

Tabela 7: Taxa de incidência da LVC segundo a área de estudo e o momento da avaliação sorológica. Monte Gordo - Camaçari

Momento da avaliação		Área intervenção	Área controle	Análise comparativa
Segundo inquérito	Cães avaliados	133	35	RR indefinido $p=0,24601730$
	Cães positivos	9 ⁽¹⁾	0	
	Incidência (%)	6,8	0	
Terceiro inquérito	Cães avaliados	87	22	RR=0,5057
	Cães positivos	2	1	(IC: 0,05- 5,33)
	Incidência (%)	2,3	4,5	$p=1,00000000$

⁽¹⁾ Dois desses animais já tinham sido positivos no DPP no inquérito anterior, mas o resultado não foi confirmado pelo ELISA

6.7 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

No cálculo da análise de sobrevivência foram considerados 416 cães soronegativos na área intervenção e 167 na área controle. A censura (perda de seguimento) foi de 187 e 67 cães, respectivamente. Ao longo do estudo, 21 cães soroconverteram na área intervenção e 11 na área controle.

A figura 9 mostra as curvas de sobrevivência das áreas intervenção e controle que ilustram a chance dos cães, ao longo do tempo de realização do estudo, tornar-se soropositivo para LVC na área intervenção, com o uso da coleira impregnada com deltametrina como medida de proteção, e na área controle, sem o uso da coleira. De acordo com a análise de Kaplan-Meier, após um ano (365 dias) de acompanhamento, os animais apresentaram 6,2% de probabilidade de soroconverter para LVC na área intervenção e 7,7% na área controle. Quando o estudo foi finalizado na área controle, após 498 dias (Figura 9 - linha tracejada), restavam 82 cães soronegativos em seguimento na área intervenção e a sobrevida foi de 92,3% nas duas áreas. O estudo foi finalizado na área intervenção após 567 dias de acompanhamento e a sobrevida reduziu para 76,4%, devido a soroconversão de mais 4 cães, porém neste ponto não foi possível comparar com a área controle, pois o acompanhamento dos cães dessa área havia sido finalizado aos 498 dias de seguimento.

Desta forma, o gráfico (figura 9) mostra uma tendência de maior tempo de sobrevida entre os cães da área intervenção. Assim como, o teste de Wilcoxon, que considera para análise principalmente os animais que soroconverteram na porção inicial do eixo tempo, mostrou maior tempo de sobrevida entre os cães da área intervenção ($\chi^2=7,18$; $p=0,0074$).

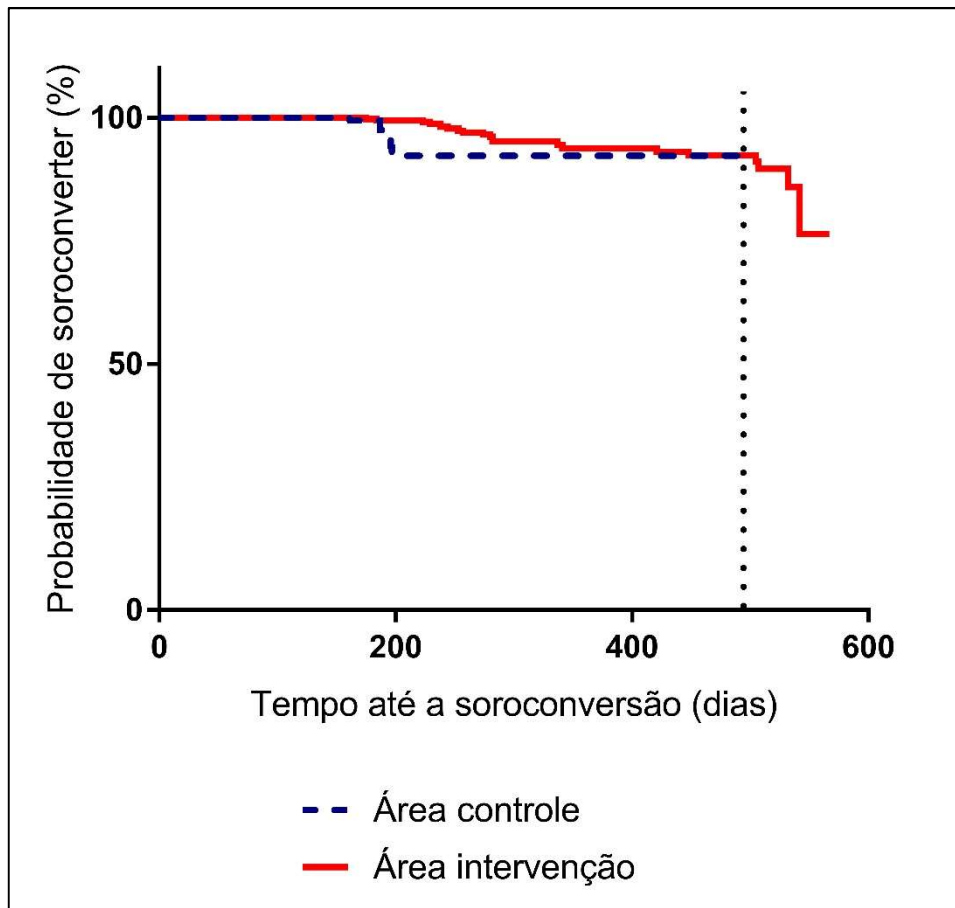


Figura 9: Curvas de sobrevivência estimadas por Kaplan-Meier, considerando a soroconversão dos cães das áreas do estudo. Monte Gordo – Camaçari. Probabilidade estimada de soroconversão, em dias, dos 416 cães da área intervenção e 167 da área controle. A linha tracejada representa o fim do período onde é possível comparar os cães das duas áreas (498 dias).

No modelo de Cox, foi estimada eficácia na proteção contra LVC de 51% devido a utilização da coleira na área intervenção, entretanto não houve associação significativa ($p=0,104$), possivelmente devido ao reduzido número de soroconversão ($n=32$) observada ao longo do estudo e a elevada perda de seguimento ocorrida.

7 DISCUSSÃO

O controle da LV ainda é uma grande preocupação em todo o mundo, apesar das pesquisas que vem sendo realizadas há anos (BOURDOISEAU *et al.*, 2009). No intuito de buscar novas alternativas para o controle da LV e da LVC, o Ministério da Saúde solicitou que estudos de campo fossem realizados por diferentes grupos de pesquisa, em diversos estados brasileiros endêmicos para LV, para testar a eficácia da coleira com deltametrina na redução da incidência da LVC. No entanto, os resultados apresentados no presente estudo não permitem afirmar que o uso da coleira é eficaz como medida de controle da LVC.

A soroprevalência da LVC no primeiro inquérito sorológico foi de 26% (105/404) na área intervenção e de 31,9% (38/119) na área controle. Em um estudo de corte transversal realizado anteriormente pela mesma equipe do presente estudo, em uma amostra da população canina de Monte Gordo – Camaçari, encontrou-se soroprevalência de 27,5% (dados não publicados). No entanto, em 2007, Julião *et al.* testaram para LVC cães de áreas de risco em Camaçari e encontraram soroprevalência de 21,7%, diferindo dos achados do presente estudo.

No segundo inquérito, a soroprevalência reduziu significativamente nas duas áreas de estudo, possivelmente decorrente da eutanásia dos cães soropositivos que foram notificados ao CCZ do município. Camargo-Neves (2011) em um estudo longitudinal, também avaliou a eficácia do uso da coleira com deltametrina integrada às medidas de controle oficiais e observou redução significativa de 10,9% para 4,2% na soroprevalência da LVC com o uso da coleira e a redução foi mantida um ano após a retirada das coleiras. No presente estudo, a redução da prevalência foi observada ao longo dos inquéritos, contudo, os animais não foram acompanhados após a retirada das coleiras.

No terceiro inquérito, a soroprevalência na área intervenção foi significativamente menor em comparação a área controle, contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na taxa de incidência. Ferroglio, Poggi e Trisciuglio (2007) em um estudo realizado na Itália, observaram que o risco de infecção por *Leishmania* reduziu 84% entre os cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina e a diferença entre a incidência da área intervenção e da área controle foi altamente significativa, diferente do resultado não significativo encontrado no presente estudo. No Irã, Gavgani *et al.* (2002), também encontraram

redução significativa na taxa de incidência da LVC entre os cães que usaram a coleira com deltametrina.

Em um estudo também realizado na Itália, onde a transmissão da LV é sazonal, Maroli e colaboradores (2001) avaliaram a eficácia da coleira com deltametrina em duas temporadas consecutivas de transmissão, comparando uma área controle com uma área intervenção. Após a primeira temporada de transmissão, os autores encontraram proteção contra LVC de 50% entre os cães da área intervenção, no entanto, a diferença entre as áreas não foi estatisticamente significativa. Somente após a segunda temporada, a proteção contra LVC aumentou para 86% entre os cães que utilizaram a coleira com deltametrina e a diferença entre as áreas passou a mostrar diferença estatisticamente significativa. No presente estudo, observou-se uma tendência de redução da taxa de incidência de LVC na área intervenção com a utilização da coleira como medida de controle e um aumento da taxa na área controle. Especulamos que o tempo de observação no nosso estudo não foi suficiente para avaliar com precisão a eficácia na redução da incidência de LVC pela utilização da coleira impregnada com deltametrina.

Na análise de sobrevivência, observou-se que a soroconversão para LVC ocorre mais rápido na área controle e o teste de Wilcoxon mostrou maior tempo de sobrevida entre os cães da área intervenção. No último dia de estudo na área controle, após 498 dias de acompanhamento, a sobrevida avaliada foi igual nas duas áreas. Na área intervenção, o estudo foi finalizado após 567 dias de acompanhamento e o tempo de sobrevida foi reduzido em razão da soroconversão de 4 cães após os 498 dias de seguimento. Dentre os quatro cães, apenas um havia permanecido com a coleira durante todo o estudo e os outros três perderam a coleira durante o acompanhamento. Apesar de um dos cães ter permanecido com a coleira ao longo do estudo, neste animal a eficácia da utilização da coleira foi provavelmente reduzida, pois o tempo de troca desta foi superior a 9 meses.

A elevada perda de seguimento ao longo do estudo e o reduzido número de cães que soroconverteram (n=32), pode ter influenciado no resultado da análise de sobrevivência. Além disso, no presente estudo foram encontradas dificuldades que podem ter influenciado negativamente na avaliação da eficácia da coleira impregnada com deltametrina a 4%, sendo elas:

i) O atraso de 2 ou 3 meses na reavaliação dos cães incluídos no estudo e na troca da coleira dos cães da área intervenção. Este atraso ocorreu devido ao trabalho

de campo ter sido realizado com apoio dos agentes de saúde do CCZ de Camaçari, que ao longo do trabalho, estiveram em duas greves, além da ocorrência de complicações no transporte da equipe até a área de estudo e o remanejamento da equipe para trabalhar na campanha de vacinação canina anti-rábica e em áreas do município com surto de Zika. Essas dificuldades e a consequente diminuição da equipe no trabalho de campo, desencadearam atrasos na realização do segundo e do terceiro inquérito sorológico e as avaliações foram realizadas com intervalo médio de 8 meses, diferente do proposto originalmente que seria a troca e reavaliação dos cães a cada 6 meses e realização de 4 inquéritos sorológicos. O atraso pode ter comprometido a eficácia da medida de controle, pois David e colaboradores (2001) mostraram que o efeito anti-alimentação provocado pela coleira com deltametrina no *Lu. longipalpis* permanece acima de 90% após 8 meses de uso da coleira, contudo, o efeito letal reduz para 35%, caindo gradualmente após 6 meses de uso da coleira, podendo reduzir a sua eficácia.

ii) O elevado número de cães novos na área intervenção que surgiram durante o estudo e que permaneceram sem a proteção da coleira, até o momento do resultado da sua avaliação sorológica e subsequente inclusão no estudo. A demora na avaliação dos novos cães pode ter afetado a eficácia da medida de controle, como relatado anteriormente por Gavgani *et al.* (2002) e Reithinger *et al.* (2004) que mostraram que a eficácia da coleira impregnada com deltametrina implementada como medida de controle da LV, depende de alta taxa de cobertura, incluindo uma rápida avaliação dos novos cães e utilização da coleira naqueles com sorologia negativa.

iii) O elevado número de cães da área intervenção que perderam a coleira com deltametrina e permaneceram sem a proteção da coleira até a avaliação seguinte. A alta taxa de perda de coleira observada no estudo (de até 64,7%) pode ter comprometido sua eficácia, pois Reithinger *et al.*, em 2004, utilizando um modelo matemático, estimaram que o impacto do uso da coleira com deltametrina como medida de controle da LVC depende do uso coletivo e da taxa de perda das coleiras. Gavgani e colaboradores (2002), em um estudo realizado no Irã, onde o período de transmissão da doença dura apenas três meses, relatou que a substituição de coleiras e a manutenção de alta taxa de cobertura no período de transmissão da LV é determinante para manter a eficácia da medida de controle. Esses autores afirmaram que isso pode ser uma desvantagem em regiões onde a transmissão da LV ocorre durante o ano todo, como no Brasil.

iv) O atraso na eutanásia dos cães soropositivos e a permanência desses animais nas áreas do estudo. Todos cães com sorologia positiva foram notificados ao CCZ de Camaçari para serem recolhidos e eutanasiados, como medida de controle preconizada pelo MS. No entanto, ao longo do estudo, o carro do CCZ que é adaptado para recolhimento desses animais ficou inutilizado por um longo período, atrasando a retirada dos animais soropositivos das áreas de estudo. Embora não tenha sido possível, obter junto ao CCZ o registro de quantos cães foram recolhidos e o tempo entre o diagnóstico e a eutanásia desses animais, observamos que no último inquérito, pelo menos 15 de 130 cães com sorologia positiva nos inquéritos anteriores permaneciam na área intervenção e 18 de 48 na área controle. Esses animais servem de fonte de infecção para o vetor flebotomíneo e assumem papel importante na propagação da doença, comprometendo a eficácia das medidas de controle avaliadas.

A densidade flebotomínea das áreas de estudo pode também ter influenciado na avaliação da eficácia da coleira. Um estudo paralelo, realizado pela nossa equipe, avaliou a densidade flebotomínica nas duas áreas. Entre os meses de abril e julho de 2015, foram realizadas capturas mensais de flebotomíneos. Na área intervenção, foram capturados 39 *Lu. longipalpis*, sendo 32 machos e 7 fêmeas e na área controle, foram capturados 12 *Lu. longipalpis*, sendo 9 machos e 3 fêmeas. Os achados sugerem maior força de transmissão da LV na área intervenção, onde foi capturada maior quantidade de flebótomos, e que pode ter influenciado nos resultados observados.

Todos os fatores citados acima devem ter afetado consideravelmente a avaliação da eficácia do uso da coleira com deltametrina como medida de controle em uma área endêmica para LVC. Assim, acredita-se que inicialmente seja mais eficaz investir em um programa de controle mais rigoroso, que realize corretamente as medidas de profilaxia já preconizadas pelo MS e que tenha recursos suficientes para executar as ações de vigilância, do que implementar novas medidas profiláticas em um programa que não funciona.

8 CONCLUSÃO

O uso da coleira impregnada com deltametrina a 4% como medida de controle não apresentou resultados conclusivos no presente estudo.

Muitos dos resultados obtidos apontaram para proteção contra LVC nos cães que utilizaram a coleira, como: i) a comparação da soroprevalência entre as áreas de estudo no último inquérito sorológico, que mostrou uma diferença estatisticamente significativa, com aumento da prevalência na área controle; ii) a razão de risco calculada, que apontou para 45% de proteção contra LVC em decorrência do uso da coleira impregnada com deltametrina entre os cães da área intervenção; iii) a análise de sobrevivência, que mostrou maior tempo de sobrevida entre os cães da área intervenção; iv) a avaliação da incidência, que evidenciou uma tendência de redução na área intervenção e aumento na área controle, com uma proteção encontrada em torno de 50%, assim como a proteção encontrada no modelo de Cox, no entanto não foi possível confirmar a proteção pela utilização da coleira, pois não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na avaliação da incidência e no modelo de Cox, devido à baixa incidência observada nas duas áreas do estudo.

Diante das dificuldades encontradas na execução do trabalho de campo, acredita-se que a implementação dessa medida de controle em países como o Brasil, onde a transmissão da doença ocorre o ano todo, a rotatividade da população canina é elevada e o número de cães errantes e semi-domiciliados é alto, representa um desafio operacional para as autoridades de saúde, pois sua eficácia depende da manutenção de altas taxas de cobertura da coleira, da rápida retirada de cães soropositivos da área e de um intenso trabalho de educação em saúde, para conscientizar a população sobre a importância da manutenção da coleira e da posse responsável.

REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A. L. et al. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 197–203, 2008.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2993–3002, 1999.
- ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 1, p. 1–18, 2003.
- ALMEIDA, M. A O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3–4, p. 227–232, 2005.
- ALMEIDA, P. S. et al. Predicting the geographic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 992–996, 2013.
- ALVAR, J. et al. Canine Leishmaniasis, Espanha. **Advances in Parasitology**, v. 57, p.1–88, 2004.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Gerais Minas, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**. v. 20, n. 1, p. 259–265, 2004.
- ANTOINE, J. C. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 779–787, 1990.
- ARIAS, J.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The Reemergence of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 145–146, 1996.
- ASHFORD, D. A. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53–57, 1998.
- AZEVEDO, M. Á. A. et al. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 127, p. 123–127, 2008.
- BATISTA, L. F. da S. et al. An assessment of the genetic diversity of *Leishmania infantum* isolates from infected dogs in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 799–806, 2012.

BELO, V. S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013.

BEVILACQUA, P. D. et al. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, 2001.
Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100001>

BOURDOISEAU, G. et al. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 71–78, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília, DF, 2006. 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota técnica conjunta N°01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Brasília, DF, 2011. p. 3.

CABRERA, M. A. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79–83, abr. 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 17, n. 5, p. 1263–1267, out. 2001.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; GOMES, A. DE C. Avaliação do hábito alimentar de. **Boletim Epidemiológico Paulista**. v. 4, n. 39, p. 2 – 7, 2007.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. DE. Avaliação do emprego das coleiras impregnadas com deltametrina 4% associada às medidas tradicionais de controle da leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil. **Conectfarma Publicações Científicas**, p. 1 – 8, 2011.

CARREIRA, J. C. A. et al. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 1 – 5, 2012.

CHANG, K. P.; DWYER, D. M. *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 147, p. 515–530, 1978.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saude Publica**, v. 24, n. 5, p. 361–372, 1990.

CUNHA, A. M. Infecções experimentais na Leishmaniose Visceral Americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, n. 4, p. 581 – 616, 1938.

CURI, N. H. de A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 99–101, fev. 2006.

DAVID, J. R. et al. Deltamethrin-impregnated Dog Collars Have a Potent Anti-feeding and Insecticidal Effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 839–847, 2001.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 239 – 243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 305–318, 2004.

DIAS, F. D. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373–1380, 2003.

FALCÃO, A. B.; PINTO, C. T.; GONTIJO, C. M. F. Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* to deltamethrin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 3, p. 395 – 396, 1988.

FERNÁNDEZ, M. S. et al. Spatial and temporal changes in *Lutzomyia longipalpis* abundance, a *Leishmania infantum* vector in an urban area in northeastern Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 817–824, 2013.

FERROGLIO, E.; POGGI, M.; TRISCIUOGLIO, A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, p. 145–148, 2007.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 52, n. 4, p. 193–196, 2010.

FOGLIA MANZILLO, V. et al. 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. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 142–145, 2006.

FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 238–245, 2010.

FRAGA, D. B. M. et al. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1 – 11, 2016.

GALATI, E. A. B. et al. Estudo de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378–390, 1997.

- GAVGANI, A. S. M. et al. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: A matched-cluster randomised trial. **The Lancet**, v. 360, p. 374–379, 2002.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1169–1180, 2005.
- HUMBERG, R. M. P. et al. Leishmania chagasi in Opossums (Didelphis albiventris) in an Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, p. 470–472, 2012.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>
- JULIÃO, F. S. et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 319 - 324, 2007.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 604–615, 2011.
- KILLICK-KENDRICK, R. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 105–111, 1997.
- LAINSON, R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the amazon region of brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 1, p. 47–56, 1985.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–27, 2005.
- LIRA, R. A. et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 11–16, 2006.
- LÓPEZ, K. et al. Factores de riesgo, representaciones y prácticas asociadas con la leishmaniasis visceral humana en un foco urbano emergente en Posadas, Argentina. **Biomédica**, v. 36, n. 1, p. 51–63, 2016.
- MAROLI, M. et al. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, p. 358–363, 2001.

- MAROLI, M. et al. Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1200–1206, 2010.
- MARZOCHI, M. C. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349–357, 1985.
- MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, p. 237–46, 1999.
- MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188–189, 2000.
- MENDES, W. DA S. et al. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 227–231, 2002.
- MENEZES, J. A. et al. Fatores de risco peridomiciliares e conhecimento sobre leishmaniose visceral da população de Formiga, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 2, p. 362–374, 2016.
- MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. p. 56-72.
- MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371–377, 2008.
- MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365–368, 2008.
- MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491–493, 1994.
- MONTEIRO, É. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147–152, 2005.
- MOREIRA, E. D. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 4, p. 393–397, 2003.
- MOREIRA, E. D. et al. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 245–252, 2004.
- MORENO, E. C. et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 456–463, 2005.

NUNES, C. M. et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 19–23, 2008.

OLIVEIRA, A. L. L. et al. Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2827–2833, 2008.

OLIVEIRA, C. D. L.; MORAIS, M. H. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2953–2958, 2008.

ORTIZ, R. C.; ANVERSA, L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 1, p. 97–104, 2015.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.

PROFETA DA LUZ, Z. M. et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 249–254, 2001.

QUINTANILHA, M. F. et al. Factors Associated With Human Visceral Leishmaniasis : Confirmed Cases And Co- Inhabitants in Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Medical and Biological Science Research**, v. 2, p. 5–13, 2016.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2948–2952, 2008.

REBÊLO, J. M. M. Freqüência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, n. 1, p. 221–227, 2001.

REITHINGER, R.; TEODORO, U.; DAVIES, C. R. Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 872–876, 2001.

REITHINGER, R. et al. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 55–62, 2004.

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara & Koogan, 2008.

SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315–317, 1998.

SANTOS, M. A. T. DOS; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides - uma visão geral. Alimentos e Nutrição. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 339–349, 2007.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 193–198, 2000.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **Journal Compilation**, v. 18, n. 4, p. 227–233, 2007.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 471–489, 2009.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, n. 7, p. 255–258, 1993.

SCHUBACH, E. Y. P.; FIGUEIREDO, F. B.; ROMERO, G. A. S. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, p. 568–574, 2014.

SHERLOCK, I. A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 511, 1984.

SHERLOCK, I. A. et al. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. VI - Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 1, p. 23–27, 1988.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671–683, 1996.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285–291, 2001.

SILVA, J. G. D. E. et al. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 7, p. 1715–1720, 2007.

SILVA, K. L. O. et al. Vacinas Contra Leishmaniose : Uma Revisão. **Archives of Health Investigation**, v. 2, n. 4, p. 18–28, 2013.

SINAN/SVS/MS. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013.** 2014.

SOARES, M. R. A. et al. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 26, n. 12, p. 2409–2413, 2010.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560–563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 1–16, 2011.

SOUZA, N. P. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 333–335, 2010.

SOUZA, A. P. L. de; JESUS, J. R. de; TEIXEIRA, M. C. Estudo retrospectivo da epidemiologia da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul : revisão de literatura. **Veterinária em Foco**, v. 11, p. 112–118, 2014.

TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania***. 1 ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013. 64p.

URBAM. **Informações sobre urbanismo e meio ambiente**. Prefeitura Municipal de Camaçari Desenvolvimento - Secad/CCTGI/GEPRO. 2010. Disponível em: <<http://www.sig.camacari.ba.gov.br/geo/>>

WERNECK, G. L. et al. Effectiveness of Insecticide Spraying and Culling of Dogs on the Incidence of *Leishmania infantum* Infection in Humans: A Cluster Randomized Trial in Teresina, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3172, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. 2015. **South-East Asia poised to defeat visceral leishmaniasis (kala-azar)**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/news/SEARO_poised_to_defeat_VL/en/>

YARED, S. et al. Risk factors of visceral leishmaniasis : a case control study in north-western Ethiopia. **Parasites & Vectors**, p. 1–11, 2014.

ANEXO – Artigo

Título

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE COLEIRAS IMPREGNADAS COM DELTAMETRINA NO CONTROLE E PREVENÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA ENDÊMICA

Nome dos autores e Afiliações

Bruna Martins Macedo Leite¹; Manuela da Silva Solcà¹; Liliane Celestino Sales Santos²; Lívia Brito Coelho^{1,2}; Leila Denise Alves Ferreira Amorim³; Gilmar Cerqueira Pereira⁴; Sandra Maria de Souza Passos⁴; Adriana Oliveira de Almeida⁴; Deborah Bittencourt Mothé Fraga^{1,2}; Patrícia Sampaio Tavares Veras^{1,5}

¹ Laboratório de Patologia e Biointervenção, Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brasil

² Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

³ Instituto de Matemática, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

⁴ Centro de Controle de Zoonoses de Camaçari, Bahia, Brasil

⁵ Instituto de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais, INCT-DT, Bahia, Brasil

Autor correspondente

Patrícia Sampaio Tavares Veras, PhD, MD
Laboratório de Patologia e Biointervenção, IGM, FIOCRUZ
Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal
Salvador/BA, Brazil; CEP 40296-710
Fax: + 55 (71) 3176-2290
E-mail: pveras@bahia.fiocruz.br

Resumo

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de grande importância na saúde pública, causada pela *Leishmania infantum*. No Brasil, o parasito é transmitido pela picada do *Lutzomyia longipalpis* e o cão é considerado o principal reservatório doméstico. As medidas de controle da LV apresentam limitações que comprometem a sua eficácia. Assim, novas estratégias precisam ser implementadas. A utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% têm apresentado resultados promissores na proteção individual de cães contra a picada do vetor flebotomíneo e como medida de controle em regiões endêmicas da Europa. Entretanto, ainda são escassos os estudos de campo que avaliaram a eficácia da utilização da coleira como medida de controle da LV em áreas onde o *Lu. longipalpis* é o vetor responsável pela transmissão. **OBJETIVO:** Avaliar a eficácia da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em cães, no controle e prevenção da

leishmaniose visceral canina (LVC) em uma área endêmica do Brasil. **MATERIAL E MÉTODOS:** Um estudo experimental longitudinal foi realizado em Camaçari - BA. A localidade foi dividida em: i) área intervenção, onde os cães soronegativos utilizaram uma coleira com deltametrina e ii) área controle, onde os cães soronegativos foram acompanhados, mas não utilizaram a coleira. Nas duas áreas foram realizadas três avaliações sorológicas dos cães domiciliados e semi-domiciliados e duas trocas de coleira na área intervenção. Os animais foram identificados pelo preenchimento de uma ficha e foram testados para LVC pelo TR DPP®LVC Bio-Manguinhos e pelo EIE®LVC Bio-Manguinhos. Os cães soropositivos foram recolhidos pelo CCZ para eutanásia e os soronegativos foram acompanhados. Bancos de dados foram construídos no programa doForms™4.1.1 e analisados no EPI INFO™7 para calcular as taxas de soroprevalência e de incidência e compará-las entre os grupos, e o programa STATA®12 foi utilizado para realizar a análise de sobrevivência, utilizando o modelo de Cox. **RESULTADOS:** No primeiro inquérito, a soroprevalência foi semelhante nas duas áreas, 26% na área intervenção e 31,9% na área controle. No segundo inquérito, houve redução significativa da soroprevalência nas duas áreas, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre as áreas. No terceiro inquérito, houve redução da soroprevalência na área intervenção e aumento na área controle. Assim, a soroprevalência foi significativamente maior na área controle e a razão de risco calculada apontou para proteção contra LVC em decorrência do uso da coleira entre os cães da área intervenção. Em relação a incidência da LVC, a taxa de proteção contra doença foi de 49% no último inquérito, entre os cães da área intervenção, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa entre as áreas. As curvas de sobrevivência das duas áreas do estudo foram comparadas pelo teste de Wilcoxon e o resultado foi estatisticamente significativo ($p=0,0074$). No modelo de Cox, a proteção contra LVC foi de 51% na área intervenção, entretanto não houve associação significativa entre a soroconversão dos cães e a área de estudo a qual eles pertenciam ($p=0,104$). **CONCLUSÃO:** A avaliação da eficácia do uso da coleira como medida de controle não apresentou resultados conclusivos e a sua implementação representa um desafio operacional para as autoridades de saúde.

Abstract

INTRODUCTION: Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis of great importance in public health, caused by *Leishmania infantum*. In Brazil, the parasite is transmitted by the bite of *Lutzomyia longipalpis* and the dog is considered the main domestic reservoir. The VL control measures have limitations that impair its efficacy. Thus, new strategies need to be implemented. The use of collars impregnated with deltamethrin 4% have shown promising results in personal protection dogs against the bite of the sandfly vector and as a control measure in endemic regions of Europe. However, there are few field studies that evaluated the efficacy of using the collar as LV control measure in areas where *Lu. longipalpis* is the vector responsible for transmission. **OBJECTIVE:** To evaluate the efficacy of using collars impregnated with deltamethrin

to 4% in dogs for control and prevention of canine visceral leishmaniasis (CVL) in an endemic area of Brazil. **MATERIAL AND METHODS:** A longitudinal experimental study was carried out in Camaçari-BA. The locality was divided into: i) intervention area where seronegative dogs used a collar with deltamethrin and ii) control area, where seronegative dogs were followed, but did not use the collar. In both areas three serologic evaluations of domiciled and semi-domiciled dogs and two collar exchanges in the intervention area were performed. Animals were identified by filling out a form and have been tested for CVL by TR DPP®LVC Bio-Manguinhos and the EIE®LVC Bio-Manguinhos. The seropositive dogs were collected by the CCZ to euthanasia and seronegative were followed. Databases were built in doFormsTM4.1.1 program and analyzed in EPI INFO™7 to calculate prevalence and incidence rates and compare them between the groups, and STATA®12 program was used to perform the survival analysis, using the model Cox. **RESULTS:** In the first survey, the seroprevalence was similar in both areas, 26% in the intervention area and 31.9% in the control area. In the second survey, there was a significant reduction in prevalence in both areas, but no statistically significant difference between the areas was observed. In the third survey, there was reduction of seroprevalence in the intervention area and increased in the control area. Thus, the seroprevalence was significantly higher in the control area and the risk ratio calculated pointed to CVL protection due to the use of the collar between the dogs from the intervention area. Regarding the incidence of CVL, disease protection rate was 49% in the last survey, among dogs of the intervention area, however the difference was not statistically significant between the areas. The survival curves of the two areas of study were compared using the Wilcoxon test and the result was statistically significant ($p=0.0074$). In the Cox model, protection against CVL was 51% in the intervention area, however there was no significant association between seroconversion of dogs and the study area to which they belong ($p=0.104$). **CONCLUSION:** Evaluation of the efficacy of the use of the collar as a control measure did not present conclusive results and its implementation is an operational challenge for health authorities.

1. Introdução

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica e de curso crônico (GONTIJO, MELO, 2004; OLIVEIRA *et al*, 2008). Devido a sua ampla distribuição geográfica e alta letalidade, essa doença apresenta grande importância para saúde pública (ALVAR, 2012). Nas Américas, a LV é uma zoonose, causada pela *Leishmania infantum* (MICHALICK, GENARO, 2005). No Brasil, a doença ocorre em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões do país, com maior número de casos na região Nordeste (SINAN/SVS/MS, 2014).

O parasito é transmitido para o homem e para outros mamíferos pela picada de fêmeas de flebotomíneos (ALVAR *et al.*, 2004), sendo a *Lutzomyia longipalpis*, a

principal espécie de flebótomo envolvida na transmissão da LV no Brasil (LAINSON, RANGEL, 2005; RANGEL, VILELA, 2008). O cão doméstico é considerado o principal reservatório urbano desse parasito, apresentando grande importância na epidemiologia da LV (BEVILACQUA *et al.*, 2001; MARZOCHI *et al.*, 1985; SHERLOCK, 1996).

As medidas de controle atualmente preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS) do Brasil para profilaxia da LV consistem em: I) diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos; II) redução da população de flebótomos com a pulverização de residências com inseticidas de ação residual; III) inquérito sorológico dos cães e eutanásia dos soropositivos; IV) investimento na educação em saúde, no intuito de conscientizar a população sobre a doença (BRASIL, 2006). Estudos mostram que estas medidas de controle apresentam limitações que as tornam pouco eficazes e apontam para a necessidade de implementação de novas estratégias que possam contribuir para a prevenção da doença (GONTIJO, MELO, 2004; OLIVEIRA, MORAIS, MACHADO-COELHO, 2008).

Dentre as estratégias de controle alternativas, estudos experimentais têm mostrado que flebótomos são susceptíveis à deltametrina em baixas concentrações (FALCÃO, PINTO, GONTIJO, 1988) e que a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% apresentam resultados promissores na proteção individual de cães contra a picada do vetor flebotomíneo (REITHINGER, TEODORO, DAVIES, 2001). Killick-Kendrick e colaboradores (1997) e David e colaboradores (2001) relataram que coleiras plásticas impregnadas com deltametrina a 4% protegeram os cães contra 96% das picadas dos flebotomíneos e essa proteção permaneceu efetiva por até 8 meses. Apesar da prevenção de picadas dos vetores interromper o ciclo de transmissão da *Leishmania* e prevenir que a infecção ocorra (MIRÓ *et al.*, 2008), existem poucos estudos de campo que avaliem a eficácia da coleira impregnada com deltametrina aplicada como medida de controle, interferindo no ciclo de transmissão da doença.

Estudos de campo realizados em áreas endêmicas da Itália (FERROGLIO, POGGI, TRISCIUOGGIO, 2007; FOGLIA MANZILLO *et al.*, 2006; MAROLI *et al.*, 2001) e do Irã (GAVGANI *et al.*, 2002) mostraram que a implementação da coleira impregnada com deltametrina como forma de controle da LVC, reduziu significativamente a taxa de soroconversão dos cães. Entretanto, os vetores responsáveis pela transmissão da *Leishmania* nas áreas estudadas são o

Phlebotomus perniciosus e o *Phlebotomus kandelaki*, vetores diferentes do *Lu. longipalpis* presente no Brasil.

No Brasil, Reithinger *et al.* (2004), utilizando um modelo matemático, estimaram que o uso de coleiras impregnadas com deltametrina como forma de controle da LVC em uma região endêmica do país teria impacto epidemiológico maior do que a eutanásia de cães soropositivos. Camargo-Neves (2011), associou o uso de coleiras impregnadas com deltametrina à eutanásia de cães soropositivos em um município endêmico de São Paulo e observou uma redução significativa na taxa de incidência da LVC. No entanto, o desenho do estudo apresenta limitações, pois os animais estudados foram diagnosticados pela reação de imunofluorescência indireta (IFI® LVC Bio-Manguinhos) em eluato de sangue dessecado em papel filtro, que apresenta baixa especificidade, além de não ter comparado os resultados obtidos na área tratada com os obtidos em uma área controle, sem implementação da coleira (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

Diante do exposto, esse estudo propõe-se a avaliar a redução da taxa de incidência da LVC por meio da utilização de coleira impregnada com deltametrina em cães de uma área endêmica comparando com resultados obtidos em uma área controle. Nossa hipótese é que a coleira impregnada com deltametrina a 4%, quando usada como medida de controle, é eficaz na redução das taxas de incidência de LVC em áreas endêmicas. Os animais do estudo foram diagnosticados com o TR-DPP® LVC e o EIE® LVC Bio-Manguinhos, que são testes sorológicos com maior especificidade em relação ao IFI® LVC Bio-Manguinhos, reduzindo assim o número de cães falso-positivos (FRAGA *et al.*, 2016); o uso das coleiras foi realizado em concomitância com as medidas oficiais de controle; e a taxa de incidência foi medida na área intervenção e em uma área controle com características similares.

2. Material e Métodos

2.1. Área do estudo

Um estudo longitudinal foi realizado na localidade de Monte Gordo, distrito do município de Camaçari - Bahia, área endêmica para LV e LVC, situado na latitude 12°41'51" e longitude 38°19'27". O município de Camaçari está localizado na Região Metropolitana de Salvador (RMS), a 41 km da capital, e abrange uma área de 784,7 Km², com população estimada de 242.970 habitantes (IBGE, 2010). O município

apresenta clima tropical úmido, com período chuvoso entre os meses de abril e junho, precipitação pluviométrica média anual superior a 1.600 mm e temperatura média anual de 25,4°C (URBAM - <http://www.sig.camacari.ba.gov.br/>). O distrito de Monte Gordo, situado na zona litorânea de Camaçari, possui população estimada em 29.573 habitantes e 8.962 domicílios (IBGE, 2010).

Em um estudo de corte transversal realizado anteriormente por uma equipe do Laboratório de Patologia e Biointervenção do Instituto Gonçalo Moniz (LPBI – IGM – FIOCRUZ – BA), para avaliação da prevalência de LVC no município de Camaçari, uma amostra randomizada de 40 cães residentes em Monte Gordo apresentou prevalência de LVC de 57,5% (dados não publicados).

2.2. Desenho do estudo e seleção dos animais

No distrito de Monte Gordo foram selecionadas duas áreas, com auxílio de croquis que foram fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Camaçari, sendo: I) uma área intervenção, onde os cães soronegativos para LVC receberam a coleira impregnada com deltametrina a 4% e II) uma área controle, onde os cães soronegativos para LVC não receberam a coleira (figura 1).

A área intervenção e a área controle eram semelhantes em relação as características ambientais. Nas duas áreas, apesar de serem urbanas, havia presença de vegetação nativa e criação de outros animais domésticos no peridomicílio das residências, como galinhas e cavalos.

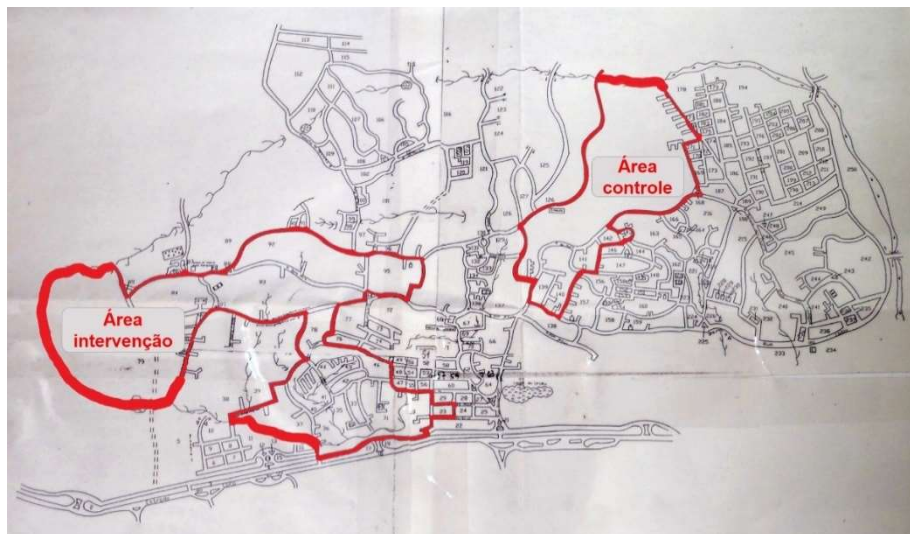


Figura 1 – Área do estudo. Área intervenção e área controle na localidade de Monte Gordo - Camaçari

Todas as residências das duas áreas foram visitadas, os proprietários que estavam presentes no momento da visita foram esclarecidos quanto ao estudo e os cães daqueles que concordavam em participar foram identificados pelo preenchimento de uma ficha, contendo dados do animal, como nome, sexo, idade e porte, e dados do proprietário, como nome, endereço e telefone para contato. Em seguida, os animais foram avaliados sorologicamente, seguindo o novo protocolo preconizado pelo MS para o diagnóstico da LVC (TR-DPP® LVC e EIE® LVC Bio-Manguinhos).

Os cães com sorologia negativa para LVC e residentes na área de intervenção, receberam coleiras impregnadas com deltametrina a 4% e essas coleiras foram trocadas a cada 7 ou 8 meses. No período do estudo, foram efetuadas três avaliações sorológicas e duas trocas de coleiras, para os cães que permaneceram sorologicamente negativos nos momentos das trocas. Os proprietários dos cães foram orientados a notificar qualquer sinal que pudesse sugerir um quadro de reação alérgica à coleira. Nestes casos, os cães foram visitados por um médico veterinário e foi aconselhada a retirada da coleira, caso o animal apresentasse qualquer sinal de hipersensibilidade.

Na área controle, os cães com sorologia negativa para LVC, foram avaliados novamente a cada 7 ou 8 meses, mas não utilizaram as coleiras impregnadas com deltametrina a 4%. No período do estudo, foram efetuadas três avaliações sorológicas.

Durante as três avaliações sorológicas, os resultados dos testes sorológicos dos cães foram repassados para os médicos veterinários responsáveis pelo Programa de Controle das Leishmanioses no CCZ de Camaçari e os cães que apresentaram sorologia positiva para LVC foram recolhidos para eutanásia, como preconizado pelo MS.

Em cada avaliação sorológica, todas as residências das duas áreas foram visitadas novamente e os cães que não tinham sido avaliados na visita anterior, foram incluídos no estudo.

2.3. Coleta de amostra e diagnóstico da LVC

Todos os cães domiciliados e semi-domiciliados da área intervenção e da área controle foram submetidos ao atual protocolo sorológico preconizado pelo MS para diagnóstico da LVC.

Os animais foram avaliados primeiramente pelo teste rápido, TR-DPP® LVC Bio-Manguinhos, seguindo as recomendações do fabricante. Durante a visita aos domicílios, foi coletada uma gota de sangue da ponta da orelha do animal para a realização do teste e a leitura do resultado foi feita em 15 minutos, na residência do proprietário.

Os cães da área intervenção que apresentaram resultado negativo no TR-DPP® LVC, receberam a coleira impregnada com deltametrina a 4% e foram avaliados novamente a cada 7 ou 8 meses. Os cães da área controle que apresentaram resultado negativo no TR-DPP® LVC, não receberam a coleira, mas também foram avaliados novamente a cada 7 ou 8 meses.

Os cães que apresentaram resultado positivo no TR-DPP® LVC foram submetidos à coleta de sangue venoso para confirmação do diagnóstico da LVC por EIE® LVC Bio-Manguinhos. Os ELISAs foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN-BA), seguindo as especificações do fabricante.

A coleta de sangue venoso dos animais com resultado positivo no TR-DPP® LVC foi realizada por punção da veia cefálica, tibial ou jugular, em um volume máximo de 5 ml, que foi acondicionado em tubos com acelerador de coagulação até a chegada ao laboratório. No Laboratório de Patologia e Biointervenção, localizado no Instituto Gonçalo Moniz (LPBI – IGM), o soro foi separado do coágulo sanguíneo e as alíquotas de soro foram identificadas e encaminhadas ao LACEN-BA para a realização do EIE® LVC Bio-Manguinhos.

Os cães das duas áreas com o diagnóstico de LVC confirmado pelo EIE® LVC, foram recolhidos para eutanásia pelo CCZ de Camaçari. Os cães da área intervenção com diagnóstico negativo no EIE® LVC, foram visitados novamente e receberam a coleira impregnada com deltametrina a 4%, sendo reavaliados novamente a cada 7 ou 8 meses, enquanto os cães da área controle com diagnóstico negativo no EIE® LVC foram avaliados novamente a cada 7 ou 8 meses, mas não receberam a coleira.

2.4. Análise estatística

Bancos de dados, compreendendo as informações obtidas nas fichas de identificação dos animais e os resultados diagnósticos, foram construídos no programa doForms™4.1.1 e analisados utilizando o programa EPI INFO™7 e o programa STATA®12.

A soroprevalência da LVC foi avaliada na área intervenção e na área controle, nos três inquéritos sorológicos da coorte canina aberta, considerando as perdas de segmento e os novos cães incluídos a cada inquérito.

As taxas de incidência da LVC no segundo e no terceiro inquérito também foram avaliadas nas duas áreas do estudo. Para o cálculo da incidência, a coorte canina foi considerada fechada, acompanhando apenas os cães com sorologia negativa no primeiro inquérito sorológico, sem inclusão de novos cães ao longo do estudo.

A comparação da soroprevalência e da taxa de incidência entre a área intervenção e a área controle foi realizada pelo teste do qui-quadrado (X^2) e pela razão de risco (RR), e foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

Em seguida, foi realizada a análise de sobrevivência no programa STATA®12, com o propósito de avaliar o tempo entre a primeira avaliação do animal e a ocorrência de soroconversão e compará-lo nas duas áreas do estudo. Na análise de sobrevivência foram considerados apenas os animais com sorologia negativa para LVC no primeiro inquérito e os animais soronegativos incluídos no segundo inquérito sorológico. Os desfechos possíveis foram soroconversão ou não. Os casos que tiveram outro desfecho, como morte do animal ou mudança de endereço, e aqueles em que o tempo até a soroconversão foi superior ao período do estudo, foram censurados. O método não paramétrico de Kaplan-Meier foi utilizado para calcular o tempo de sobrevida nas áreas de estudo e construir as curvas de sobrevivência. O teste de Wilcoxon foi utilizado para testar se houve diferença no tempo de sobrevida entre as áreas. A razão de risco (RR) para o uso da coleira com deltametrina foi calculada, na análise de sobrevivência, pelo modelo de Cox, com intervalo de confiança de 95%. Em todas as análises, a diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

2.5. Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado (Protocolo nº 29/2013) no Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). A eutanásia dos cães soropositivos para LVC foram realizadas no CCZ de Camaçari, Bahia. Todos os procedimentos seguiram as normas técnicas estabelecidas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (Resolução CFMV nº 714/2002).

Todos os proprietários que concordaram em participar do estudo assinaram voluntariamente um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3. Resultados

3.1. Dinâmica do estudo experimental

O estudo longitudinal ocorreu entre janeiro de 2014 e novembro de 2015, quando foram realizados três inquéritos sorológicos nas duas áreas de estudo, com uma média de 8 meses de intervalo entre os inquéritos.

No primeiro inquérito sorológico (*baseline*) foram avaliados 404 animais na área intervenção e 119 animais na área controle. Os dados descritivos dos animais avaliados durante o primeiro inquérito estão na tabela 1. A distribuição de idade, raça e porte dos animais não mostrou diferenças estatisticamente significativas nas duas áreas do estudo, apesar do percentual de machos na área intervenção (55,7%) ter sido maior do que o encontrado na área controle (47,9%).

Em relação a avaliação sorológica dos cães durante o primeiro inquérito, 65,6% (265/404) dos animais avaliados na área intervenção foram negativos para LVC no TR-DPP® LVC Bio-Manguinhos e receberam a coleira impregnada com deltametrina a 4%. Em contrapartida, 34,4% (139/404) dos cães apresentaram resultado positivos no teste rápido e foram submetidos à coleta de sangue venoso para confirmação do diagnóstico por EIE® LVC Bio-Manguinhos. O ELISA confirmou a positividade de 26% (105/404) dos animais avaliados e esses foram notificados ao CCZ de Camaçari. Os cães negativos no EIE® LVC foram visitados novamente e receberam a coleira impregnada com deltametrina.

Na área controle, 61,3% (73/119) dos cães avaliados no primeiro inquérito sorológico foram negativos no teste rápido para LVC e incluídos no estudo para serem avaliados novamente nos inquéritos seguintes. No entanto, 38,7% (46/119) dos cães apresentaram resultado reagente no TR-DPP® LVC e foram testados no EIE® LVC Bio-Manguinhos, assim como ocorreu na área intervenção, e a positividade foi confirmada em 31,9% (38/119) dos animais avaliados. Os cães negativos no ELISA também foram incluídos no estudo de seguimento.

Tabela 1: Caracterização dos cães avaliados no primeiro inquérito sorológico (*baseline*) das áreas de estudo na localidade de Monte Gordo - Camaçari

Características dos cães	Área intervenção n/N (%)	Área controle n/N (%)	<i>p</i> -valor
Sexo			
Macho	225/404 (55,7%)	57/119 (47,9%)	0,16316650
Fêmea	179/404 (44,3%)	62/119 (52,1%)	
Idade			
Filhote (0-1 anos)	90/388 (23,2%)	22/116 (19%)	0,76069
Jovem (1-2 anos)	118/388 (30,4%)	42/116 (36,2%)	
Adulto Jovem (3-4 anos)	82/388 (21,1%)	26/116 (22,4%)	
Adulto (4-7 anos)	62/388 (16%)	19/116 (16,4%)	
Idoso (> 7 anos)	36/388 (9,3%)	7/116 (6%)	
Raça			
Mestiço	306/386 (79,3%)	98/115 (85,2%)	0,20009629
Puro	80/386 (20,7%)	17/115 (14,8%)	
Porte			
Toy (0,1-3 kg)	12/398 (3,0%)	3/116 (2,6%)	0,95701
Pequeno (4-10 kg)	173/398 (43,5%)	50/116 (43,1%)	
Médio (11-20 kg)	171/398 (43%)	53/116 (45,7%)	
Grande (21-40 kg)	41/398 (10,3%)	10/116 (8,6%)	
Gigante (>40 kg)	1/398 (0,2%)	0/116 (0%)	

No segundo inquérito, a avaliação sorológica foi realizada em 167 novos cães na área intervenção e repetida em apenas 44,5% (133/299) dos animais que tinham sido negativos no primeiro inquérito, devido a elevada perda de segmento. Na área controle, foram avaliados 96 novos cães e os exames foram repetidos em 43,2% (35/81) dos animais que tinham resultados negativos anteriormente. Assim, no segundo inquérito foram avaliados 300 animais na área intervenção e 131 na área

controle. O número de cães avaliados e o número de perdas de segmento em cada inquérito sorológico é mostrado nas tabelas 2 e 3, respectivamente. A distribuição de idade, raça, porte e sexo dos animais perdidos ao longo do acompanhamento não mostrou diferenças estatisticamente significativas nas duas áreas do estudo.

Tabela 2: Número de cães avaliados segundo a área de estudo e o momento da avaliação. Monte Gordo - Camaçari

Área	Número de cães avaliados	1º inquérito	2º inquérito	3º inquérito
Intervenção	Antigos reavaliados	---	133 (44,3%)	223 (59%)
	Novos incluídos	404	167 (55,7%)	155 (41%)
	Total	404	300	378
Controle	Antigos reavaliados	---	35 (26,7%)	87 (45,1%)
	Novos incluídos	119	96 (73,3%)	106 (54,9%)
	Total	119	131	193

Na avaliação sorológica realizada durante o segundo inquérito, 82,3% (247/300) dos cães examinados na área intervenção apresentaram resultado negativo no teste rápido para LVC e receberam a coleira impregnada com deltametrina. Em contrapartida, 17,3% (53/300) dos cães apresentaram resultado positivo no TR-DPP® LVC e foram testados no ELISA. A LVC foi confirmada em 8,3% (25/300) dos animais avaliados e a coleira com deltametrina também foi colocada nos 28 cães com resultado negativo no EIE® LVC.

Na área controle, o TR-DPP® LVC foi negativo para 88,5% (116/131) dos cães avaliados no segundo inquérito. No entanto, 11,5% (15/131) dos cães apresentaram resultado suspeitos de LVC no teste rápido e 7,6% (10/131) foram confirmados no EIE® LVC.

Tabela 3: Perda de seguimento de cães durante o estudo longitudinal, segundo o motivo da perda, a área de estudo e o momento da avaliação em Monte Gordo – Camaçari

Motivo da perda	Área intervenção		Área controle	
	Entre o 1º e o 2º inquérito	Entre o 2º e o 3º inquérito	Entre o 1º e o 2º inquérito	Entre o 2º e o 3º inquérito
Animais positivos com indicação de eutanásia	105 (38,7%)	25 (20,2%)	38 (45,2%)	10 (16,7%)
Animais que apresentaram reações alérgicas a coleira com deltametrina	1 (0,4%)	2 (1,6%)	---	---
Animais doados / vendidos / abandonados na rua	10 (3,7%)	15 (12,1%)	2 (2,4%)	4 (6,7%)
Animais fugiram / sumiram / foram roubados	9 (3,3%)	4 (3,2%)	0	2 (3,3%)
Animais morreram / foram recolhidos pelo CCZ	31 (11,4%)	29 (23,4%)	7 (8,3%)	6 (10,0%)
Animais mudaram de endereço	3 (1,1%)	5 (4,0%)	0	3 (5,0%)
Não foi possível contato com os proprietários ⁽¹⁾	106 (39,1%)	43 (34,7%)	35 (41,7%)	0
Recusa dos proprietários	6 (2,2%)	1 (0,8%)	2 (2,4%)	35 (58,3%)
Total de animais perdidos ⁽²⁾	271	124	84	60

⁽¹⁾ 47 cães que tinham sido perdidos entre o primeiro e o segundo inquérito na área intervenção e 16 cães perdidos na área controle, foram avaliados novamente no terceiro inquérito

⁽²⁾ Não houve diferença estatisticamente significativa no total de animais perdidos entre as áreas do estudo ($p=0,5$ nos dois momentos)

No terceiro e último inquérito sorológico foram avaliados 378 cães na área intervenção, sendo que destes 155 foram de novas inclusões, e 193 cães na área controle, com 106 destes sendo de novos animais incluídos no estudo (tabela 2). Na área intervenção, 84,7% (320/378) dos cães avaliados pelo TR-DPP® LVC apresentaram resultado negativo e receberam a coleira com deltametrina. Contudo, 15,3% (58/378) dos cães apresentaram resultado positivo no teste rápido e foram testados no EIE® LVC. A doença foi confirmada em 6,3% (24/378) dos animais

avaliados. A coleira com deltametrina foi colocada nos 34 cães com resultado negativo no ELISA.

Na área controle, 80,8% (156/193) dos cães tiveram resultado negativo no TR-DPP® LVC no último inquérito sorológico. Entretanto, 19,2% (37/193) dos cães avaliados foram reagentes no DPP e 11,4% (22/193) tiveram o diagnóstico de LVC confirmado pelo ELISA.

3.2. Avaliação da persistência no uso da coleira impregnada com deltametrina a 4%

Ao longo do estudo foram utilizadas 928 coleiras impregnadas com deltametrina em cães com sorologia negativa, sendo 299 utilizadas no primeiro inquérito, 275 no segundo inquérito e 354 no terceiro inquérito.

Os cães receberam de uma a três coleiras, de acordo com o seu tempo de permanência no estudo. No entanto, o número de perda de coleiras foi elevado e menos de 42% dos cães que repetiram a avaliação sorológica no inquérito seguinte permaneceram com a coleira no pescoço até o momento da troca (tabela 4).

No primeiro inquérito, um animal apresentou reação alérgica a coleira e o proprietário optou por tirar o animal do estudo. No inquérito seguinte, dois cães do mesmo proprietário também apresentaram sinais de reação alérgica e foram retirados no estudo. No terceiro inquérito, seis cães que tinham sido avaliados anteriormente, estavam sem coleira porque apresentaram sinais de reação alérgica, porém os proprietários concordaram em avaliar novamente os animais, sem utilizar a coleira.

Tabela 4: Número de cães da área intervenção que permaneceram com a coleira no pescoço até a sua troca, segundo o momento da avaliação sorológica. Monte Gordo - Camaçari

Momento da avaliação		N (%)
Primeiro inquérito	Cães que receberam a coleira	299
	Cães que foram avaliados no inquérito seguinte	133 (44,5%)
	Cães que permaneceram com a coleira até a troca	47 (35,3%)
Segundo inquérito	Cães que receberam a coleira	275
	Cães que foram avaliados no inquérito seguinte	176 (64,0%)
	Cães que permaneceram com a coleira até a troca	73 (41,5%)

3.3. Taxa de soroprevalência

A soroprevalência de LVC nos animais avaliados no primeiro inquérito foi maior numericamente na área controle, entretanto não houve diferença estatística entre as duas áreas do estudo (tabela 5).

No segundo inquérito sorológico, após a introdução das medidas de controle, houve uma redução significativa na soroprevalência nas duas áreas. Contudo, quando foi comparada entre as áreas do estudo, a diferença entre as soroprevalências não foi estatisticamente significativa.

No terceiro inquérito, houve redução da soroprevalência na área intervenção e aumento na área controle. Assim, a soroprevalência foi significativamente maior na área controle e a razão de risco calculada sugeriu proteção contra LVC de 45%, em decorrência do uso da coleira impregnada com deltametrina entre os cães da área intervenção.

Tabela 5: Taxa de soroprevalência da LVC segundo a área de estudo e o momento da avaliação sorológica. Monte Gordo – Camaçari

Momento da avaliação		Área intervenção	Área controle	Análise comparativa
Primeiro inquérito (<i>baseline</i>)	Cães avaliados	404	119	RR=0,8139
	Cães positivos	105	38	IC: 0,60 - 1,11
	Soroprevalência (%)	26,0 ^(a)	31,9 ^(b)	$p=0,24551615$
Segundo inquérito	Cães avaliados	300	131	RR=1,0917
	Cães positivos	25	10	IC: 0,54 - 2,20
	Soroprevalência (%)	8,3 ^(a)	7,6 ^(b)	$p=0,95779003$
Terceiro inquérito	Cães avaliados	378	193	RR=0,5570
	Cães positivos	24	22	IC: 0,32 - 0,97
	Soroprevalência (%)	6,3	11,4	$p=0,05302243$

^(a) e ^(b) Análise comparativa dentro a mesma área de estudo, entre o primeiro e o segundo inquérito:

^(a) RR=3,1188 (IC=2,07 – 4,70; $p=0,00000000$)

^(b) RR=4,1832 (IC=2,18 – 8,02; $p=0,00000247$)

3.4. Dinâmica do estudo experimental de coorte canina fechada

No intuito de determinar e comparar a incidência da LVC nas áreas estudadas, foram selecionados entre os cães incluídos no estudo apenas aqueles avaliados sistematicamente desde o primeiro inquérito sorológico, sem a inclusão de novos cães nos inquéritos seguintes ou retorno de cães que haviam sido perdidos, mas que haviam sido avaliados anteriormente. Desta forma, dentre os 404 cães avaliados inicialmente na área intervenção e os 119 cães na área controle, foram acompanhados ao longo do estudo os animais que apresentaram sorologia negativa para LVC, que foram respectivamente 299 cães na área intervenção e 81 na área controle.

Na área intervenção, no segundo inquérito a avaliação sorológica foi repetida em apenas 44,5% (133/299) dos cães incluídos no estudo longitudinal. Entre os cães avaliados no segundo inquérito, 93,2% (124/133) apresentaram resultado negativo nos testes sorológicos e receberam a coleira com deltametrina, e 6,8% (9/133)

apresentaram resultado positivo e foram notificados ao CCZ. No terceiro inquérito, a avaliação sorológica foi repetida em 87 cães, sendo 97,7% (85/87) soronegativo e 2,3% (2/87) com sorologia positiva para LVC.

Na área controle, no segundo inquérito a avaliação sorológica foi repetida em apenas 43,2% (35/81) dos cães incluídos no acompanhamento. Entre os cães avaliados no segundo inquérito, nenhum apresentou sorologia positiva. No terceiro inquérito, 22 cães foram avaliados, sendo 95,5% (21/22) soronegativo e 4,5% (1/22) soropositivo para LVC.

Em relação a incidência da LVC avaliada na coorte canina fechada, houve redução da taxa na área intervenção entre o segundo e o terceiro inquérito, enquanto que na área controle houve aumento da incidência. A taxa de eficácia da coleira contra a LVC foi de 49% entre os cães da área intervenção (tabela 6). No entanto, não houve qualquer alteração estatisticamente significativa na incidência da LVC ao longo do estudo.

A taxa de incidência também foi calculada e avaliada de forma estratificada entre os cães da área intervenção que permaneceram com a coleira entre os inquéritos sorológicos e aqueles que perderam a coleira. Contudo, não foi observada qualquer alteração estatisticamente significativa entre os dois grupos ao longo do estudo.

Tabela 6: Taxa de incidência da LVC segundo a área de estudo e o momento da avaliação sorológica. Monte Gordo - Camaçari

Momento da avaliação		Área intervenção	Área controle	Análise comparativa
Segundo inquérito	Cães avaliados	133	35	RR indefinido $p=0,24601730$
	Cães positivos	9 ⁽¹⁾	0	
	Incidência (%)	6,8	0	
Terceiro inquérito	Cães avaliados	87	22	RR=0,5057
	Cães positivos	2	1	(IC: 0,05- 5,33)
	Incidência (%)	2,3	4,5	$p=1,00000000$

⁽¹⁾ Dois desses animais já tinham sido positivos no DPP no inquérito anterior, mas o resultado não foi confirmado pelo ELISA

3.5. Análise de sobrevivência

No cálculo da análise de sobrevivência foram considerados 416 cães soronegativos na área intervenção e 167 na área controle. A censura (perda de seguimento) foi de 187 e 67 cães, respectivamente. Ao longo do estudo, 21 cães soroconverteram na área intervenção e 11 na área controle.

A figura 2 mostra as curvas de sobrevivência das áreas intervenção e controle que ilustram a chance dos cães, ao longo do tempo de realização do estudo, tornar-se soropositivo para LVC na área intervenção, com o uso da coleira impregnada com deltametrina como medida de proteção, e na área controle, sem o uso da coleira. De acordo com a análise de Kaplan-Meier, após um ano (365 dias) de acompanhamento, os animais apresentaram 6,2% de probabilidade de soroconverter para LVC na área intervenção e 7,7% na área controle. Quando o estudo foi finalizado na área controle, após 498 dias (Figura 2 - linha tracejada), restavam 82 cães soronegativos em seguimento na área intervenção e a sobrevida foi de 92,3% nas duas áreas. O estudo foi finalizado na área intervenção após 567 dias de acompanhamento e a sobrevida reduziu para 76,4%, devido a soroconversão de mais 4 cães, porém neste ponto não foi possível comparar com a área controle, pois o acompanhamento dos cães dessa área havia sido finalizado aos 498 dias de seguimento.

Desta forma, o gráfico (figura 2) mostra uma tendência de maior tempo de sobrevida entre os cães da área intervenção. Assim como, o teste de Wilcoxon, que considera para análise principalmente os animais que soroconverteram na porção inicial do eixo tempo, mostrou maior tempo de sobrevida entre os cães da área intervenção ($\chi^2=7,18$; $p=0,0074$).

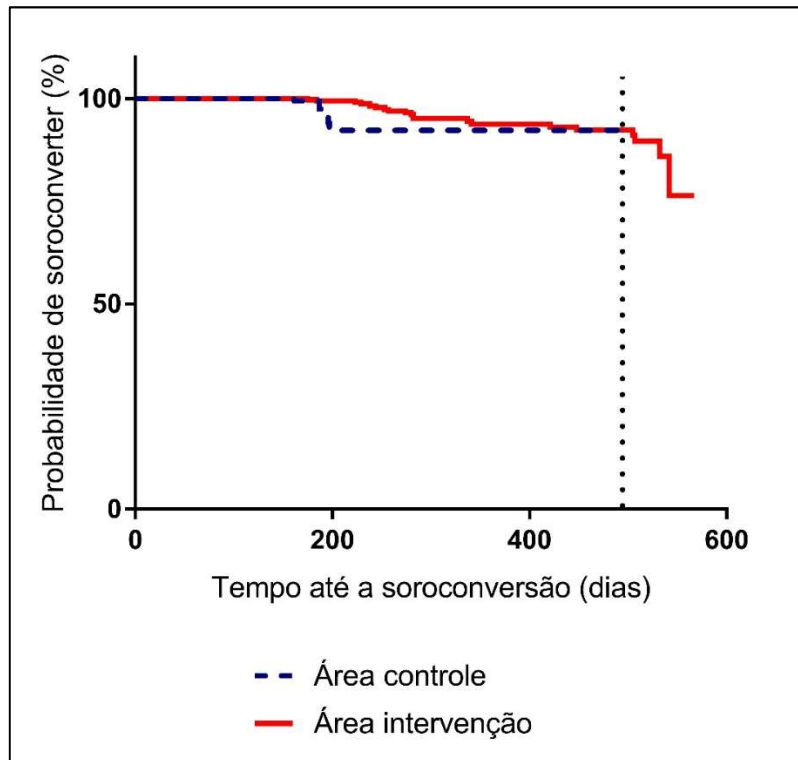


Figura 2: Curvas de sobrevivência estimadas por Kaplan-Meier, considerando a soroconversão dos cães das áreas do estudo. Monte Gordo – Camaçari. Probabilidade estimada de soroconversão, em dias, dos 416 cães da área intervenção e 167 da área controle. A linha tracejada representa o fim do período onde é possível comparar os cães das duas áreas (498 dias).

No modelo de Cox, foi estimada eficácia na proteção contra LVC de 51% devido a utilização da coleira na área intervenção, entretanto não houve associação significativa ($p=0,104$), possivelmente devido ao reduzido número de soroconversão ($n=32$) observada ao longo do estudo e a elevada perda de seguimento ocorrida.

4. Discussão

A soroprevalência da LVC no primeiro inquérito sorológico foi de 26% (105/404) na área intervenção e 31,9% (38/119) na área controle. Em um estudo de corte transversal realizado anteriormente pela mesma equipe do presente estudo, em uma amostra da população canina de Monte Gordo – Camaçari, encontrou soroprevalência

de 27,5% (dados não publicados). No entanto, em 2007, Julião *et al.* testaram para LVC cães de áreas de risco em Camaçari e encontraram soroprevalência de 21,7%, diferindo dos achados do presente estudo.

No segundo inquérito, a soroprevalência reduziu significativamente nas duas áreas de estudo, possivelmente decorrente da eutanásia dos cães soropositivos que foram notificados ao CCZ do município. Camargo-Neves (2011) em um estudo longitudinal, também avaliou a eficácia do uso da coleira com deltametrina integrada as medidas de controle oficiais e observou redução significativa de 10,9% para 4,2% na soroprevalência da LVC com o uso da coleira e a redução foi mantida um ano após a retirada das coleiras. No presente estudo, a redução da prevalência foi observada ao longo dos inquéritos, contudo, os animais não foram acompanhados após a retirada das coleiras.

No terceiro inquérito, a soroprevalência na área intervenção foi significativamente menor em comparação a área controle, contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na taxa de incidência. Ferroglio, Poggi e Trisciuglio (2007) em um estudo realizado na Itália, observaram que o risco de infecção por *Leishmania* reduziu 84% entre os cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina e a diferença entre a incidência da área intervenção e da área controle foi altamente significativa, diferente do resultado não significativo encontrado no presente estudo. No Irã, Gavgani *et al.* (2002), também encontraram redução significativa na taxa de incidência da LVC entre os cães que usaram a coleira com deltametrina.

Em um estudo também realizado na Itália, onde a transmissão da LV é sazonal, Maroli e colaboradores (2001) avaliaram a eficácia da coleira com deltametrina em duas temporadas consecutivas de transmissão, comparando uma área controle com uma área intervenção. Após a primeira temporada de transmissão, os autores encontraram proteção contra LVC de 50% entre os cães da área intervenção, no entanto a diferença entre as áreas não foi estatisticamente significativa. Somente após a segunda temporada, a proteção contra LVC aumentou para 86% entre os cães que utilizaram a coleira com deltametrina e a diferença entre as áreas passou a mostrar diferença estatisticamente significativa. No presente estudo, observou-se uma tendência de redução da taxa de incidência de LVC na área intervenção com a utilização da coleira como medida de controle e um aumento da taxa na área controle. Especulamos que o tempo de observação no nosso estudo não foi suficiente para

avaliar com precisão a eficácia na redução da incidência de LVC pela utilização da coleira impregnada com deltametrina.

Na análise de sobrevivência, observou-se que a soroconversão para LVC ocorre mais rápido na área controle e o teste de wilcoxon mostrou maior tempo de sobrevida entre os cães da área intervenção. No último dia de estudo na área controle, após 498 dias de acompanhamento, a sobrevida avaliada foi igual nas duas áreas. Na área intervenção, o estudo foi finalizado após 567 dias de acompanhamento e o tempo de sobrevida foi reduzido em razão da soroconversão de 4 cães após os 498 dias de seguimento. Dentre os quatro cães, apenas um havia permanecido com a coleira durante todo o estudo e os outros três perderam a coleira durante o acompanhamento. Apesar de um dos cães ter permanecido com a coleira ao longo do estudo, neste animal a eficácia da utilização da coleira foi provavelmente reduzida, pois o tempo de troca desta foi superior a 9 meses.

A elevada perda de seguimento ao longo do estudo e o reduzido número de cães que soroconverteram (n=32), pode ter influenciado no resultado da análise de sobrevivência. Além disso, no presente estudo foram encontradas dificuldades que podem ter influenciado negativamente na avaliação da eficácia da coleira impregnada com deltametrina a 4%, sendo elas:

i) O atraso de 2 ou 3 meses na reavaliação dos cães incluídos no estudo e na troca da coleira dos cães da área intervenção.

Este atraso ocorreu devido ao trabalho de campo ter sido realizado com apoio dos agentes de saúde do CCZ de Camaçari, que ao longo do trabalho, estiveram em duas greves, além da ocorrência de complicações no transporte da equipe até a área de estudo e o remanejamento da equipe para trabalhar na campanha de vacinação canina anti-rábica e em áreas do município com surto de zika. Essas dificuldades e a consequente diminuição da equipe no trabalho de campo, desencadearam atrasos na realização do segundo e do terceiro inquérito sorológico e as avaliações foram realizadas com intervalo médio de 8 meses, diferente do proposto originalmente que seria a troca e reavaliação dos cães a cada 6 meses e realização de 4 inquéritos sorológicos.

O atraso pode ter comprometido a eficácia da medida de controle, pois David e colaboradores (2001) mostraram que o efeito anti-alimentação provocado pela coleira com deltametrina no *Lu. longipalpis* permanece acima de 90% após 8 meses de uso

da coleira, contudo, o efeito letal reduz para 35%, caindo gradualmente após 6 meses de uso da coleira, podendo reduzir a sua eficácia.

ii) O elevado número de cães novos na área intervenção que surgiram durante o estudo e que permaneceram sem a proteção da coleira até o momento do resultado da sua avaliação sorológica e subsequente inclusão no estudo.

A demora na avaliação dos novos cães pode ter afetado a eficácia da medida de controle, como relatado anteriormente por Gavgani *et al.* (2002) e Reithinger *et al.* (2004) que mostraram que a eficácia da coleira impregnada com deltametrina implementada como medida de controle da LV, depende de alta taxa de cobertura, incluindo uma rápida avaliação dos novos cães e utilização da coleira naqueles com sorologia negativa.

iii) O elevado número de cães da área intervenção que perderam a coleira com deltametrina e permaneceram sem a proteção da coleira até a avaliação seguinte.

A alta taxa de perda de coleira observada no estudo (de até 64,7%) pode ter comprometido sua eficácia, pois Reithinger *et al.*, em 2004, utilizando um modelo matemático, estimaram que o impacto do uso da coleira com deltametrina como medida de controle da LVC depende do uso coletivo e da taxa de perda das coleiras.

Gavgani e colaboradores (2002), em um estudo realizado no Irã, onde o período de transmissão da doença dura apenas três meses, relatou que a substituição de coleiras e a manutenção de alta taxa de cobertura no período de transmissão da LV é determinante para manter a eficácia da medida de controle. Esses autores afirmaram que isso pode ser uma desvantagem em regiões onde a transmissão da LV ocorre durante o ano todo, como no Brasil.

iv) O atraso na eutanásia dos cães soropositivos e a permanência desses animais nas áreas do estudo.

Todos cães com sorologia positiva foram notificados ao CCZ de Camaçari para serem recolhidos e eutanasiados, como medida de controle preconizada pelo MS. No entanto, ao longo do estudo, o carro do CCZ que é adaptado para recolhimento desses animais ficou inutilizado por um longo período, atrasando a retirada dos animais soropositivos das áreas de estudo. Embora não tenha sido possível obter junto ao CCZ o registro de quantos cães foram recolhidos e o tempo entre o diagnóstico e a eutanásia desses animais, observamos que no último inquérito, pelo menos 15 de 130 cães com sorologia positiva nos inquéritos anteriores permaneciam na área intervenção e 18 de 48 na área controle. Esses animais servem de fonte de infecção

para o vetor flebotômíneo e assumem papel importante na propagação da doença, comprometendo a eficácia das medidas de controle avaliadas.

A densidade flebotômínea das áreas de estudo pode também ter influenciado na avaliação da eficácia da coleira. Um estudo paralelo, realizado pela nossa equipe, avaliou a densidade flebotômínea das duas áreas. Entre os meses de abril e julho de 2015, foram realizadas capturas mensais de flebotômíneos. Na área intervenção, foram capturados 39 *Lu. longipalpis*, sendo 32 machos e 7 fêmeas e na área controle, foram capturados 12 *Lu. longipalpis*, sendo 9 machos e 3 fêmeas. Os achados sugerem maior força de transmissão da LV na área intervenção, onde foi capturada maior quantidade de flebótomos, e que pode ter influenciado nos resultados observados.

Todos os fatores citados acima devem ter afetado consideravelmente a avaliação da eficácia do uso da coleira com deltametrina como medida de controle em uma área endêmica para LVC. Assim, acredita-se que inicialmente seja mais eficaz investir em um programa de controle mais rigoroso, que realize corretamente as medidas de profilaxia já preconizadas pelo MS e que tenha recursos suficientes para executar as ações de vigilância, do que implementar novas medidas profiláticas em um programa que não funciona.

5. Conclusão

O uso da coleira impregnada com deltametrina a 4% como medida de controle não apresentou resultados conclusivos no presente estudo.

Muitos dos resultados obtidos apontaram para proteção contra LVC nos cães que utilizaram a coleira, como: i) a comparação da soroprevalência entre as áreas de estudo no último inquérito sorológico, que mostrou uma diferença estatisticamente significativa, com aumento da prevalência na área controle; ii) a razão de risco calculada, que apontou para 45% de proteção contra LVC em decorrência do uso da coleira impregnada com deltametrina entre os cães da área intervenção; iii) a análise de sobrevivência, que mostrou maior tempo de sobrevivência entre os cães da área intervenção; iv) a avaliação da incidência, que evidenciou uma tendência de redução na área intervenção e aumento na área controle, com uma proteção encontrada em torno de 50%, assim como a proteção encontrada no modelo de Cox, no entanto não foi possível confirmar a proteção pela utilização da coleira, pois não foram observadas

diferenças estatisticamente significativas na avaliação da incidência e no modelo de Cox, devido à baixa incidência observada nas duas áreas do estudo.

Diante das dificuldades encontradas na execução do trabalho de campo, acredita-se que a implementação dessa medida de controle em países como o Brasil, onde a transmissão da doença ocorre o ano todo, a rotatividade da população canina é elevada e o número de cães errantes e semi-domiciliados é alto, representa um desafio operacional para as autoridades de saúde, pois sua eficácia depende da manutenção de altas taxas de cobertura da coleira, da rápida retirada de cães soropositivos da área e de um intenso trabalho de educação em saúde, para conscientizar a população sobre a importância da manutenção da coleira e da posse responsável.

6. Referências

ALVAR, J. et al. **Canine Leishmaniasis**, Espanha: *Advances in parasitology*. 2004, v. 57, p.1–88.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**. Austrália, v. 7, n. 5, 2012.

BEVILACQUA, P. D. et al. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 53, n. 1, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100001>

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília, DF, 2006, p. 120.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. DE. Avaliação do emprego das coleiras impregnadas com deltametrina 4% associada às medidas tradicionais de controle da leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil. **Conectfarma Publicações Científicas Ltda**. São Paulo, p. 1 – 8, 2011.

DAVID, J. R. et al. Deltamethrin-impregnated Dog Collars Have a Potent Anti-feeding and Insecticidal Effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 839–847, 2001.

FALCÃO, A. B.; PINTO, C. T.; GONTIJO, C. M. F. Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* to deltamethrin. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p. 395 – 396, 1988.

FERROGLIO, E.; POGGI, M.; TRISCIUOGLIO, A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. **Zoonoses and Public Health**. Itália v. 55, p. 145–148, 2007.

FOGLIA MANZILLO, V. et al. 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. **Veterinary Parasitology**. Itália, v. 142, p. 142–145, 2006.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2010. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/>>

JULIÃO, F. S. et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**. Bahia, v. 27, n. 8, p. 319 - 324, 2007.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and veterinary entomology**. Reino Unido, v. 11, p. 105–111, 1997.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811–27, 2005.

MAROLI, M. et al. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. **Medical and Veterinary Entomology**. Itália, v. 15, p. 358–363, 2001.

MARZOCHI, M. C. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 349–357, 1985.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Ed. Atheneu. p. 56-72. 2005.

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**. Israel, v. 24, n. 8, p. 371–377, 2008.

OLIVEIRA, A. L. L. et al. Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. Mato Grosso do Sul, v. 24, n. 12, p. 2827–2833, 2008.

OLIVEIRA, C. D. L.; MORAIS, M. H. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. **Cadernos de Saúde Pública**. Minas Gerais, v. 24, n. 12, p. 2953–2958, 2008.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2948–2952, 2008.

REITHINGER, R.; TEODORO, U.; DAVIES, C. R. Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**. Reino Unido, v. 7, n. 5, p. 872–876, 2001.

REITHINGER, R. et al. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**. Reino Unido, v. 34, p. 55–62, 2004.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, p. 671–683, 1996.

SINAN/SVS/MS. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. 2014.