

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze del Farmaco

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

## CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA



TESI DI LAUREA

### **Leishmaniosi canina: prevenzione, diagnosi e terapia**

Relatore: Prof. Marco De Liguoro

Correlatore: Prof. Antonio Frangipane di Regalbono

Laureanda: **Barzon Roberta**

ANNO ACCADEMICO: 2021-2022

# INDICE

INDICE.....	2
RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT.....	5
INTRODUZIONE.....	6
Storia.....	8
Obiettivi della Tesi.....	13
Leishmania infantum.....	14
BIOLOGIA.....	14
SERBATOI DEL NOSTRO PAESE.....	18
DIFFUSIONE.....	19
FATTORI FAVORENTI.....	21
DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA.....	24
In passato.....	25
Situazione attuale.....	27
DIAGNOSI LEISHMANIOSI.....	34
Segni clinici.....	34
Metodi diagnostici.....	40
Metodi diretti.....	42
Microscopia (metodo Giemsa).....	43
Esame colturale.....	44
Inoculazione del parassita in animali da laboratorio.....	44
Xenodiagnosi.....	45
PCR.....	45
Metodi indiretti.....	47
Tecniche immunoistochimiche (IHC).....	47
Immunodiagnosi.....	48
Immunità cellulare.....	48
Test di Montenegro (o alla Leishmanina).....	48
Immunità umorale.....	49
IFAT.....	49
DAT.....	51
Test ELISA.....	51
Western blot (WB).....	52

Immunocromatografia .....	53
PREVENZIONE.....	55
Definizione di cane esposto .....	55
Definizione di cane infetto .....	55
Definizione di cane malato.....	55
Definizione di cane malato con quadro clinico grave .....	56
Collari deltametrina (DEL) .....	59
Collari flumetrina/imidacloprid (FLU/IMI) .....	60
Confronto tra collare DEL e collare FLU/IMI .....	64
Spot-on .....	65
Spot-on ExSpot .....	66
Spot-on Vectra® .....	68
Spot-on Frontline Tri-Act® .....	70
Spot-on Advantix.....	71
Spray.....	74
TERAPIA.....	77
Allopurinolo.....	79
Antimonio Pentavalente .....	82
Associazione Antimoniato di meglumina/Allopurinolo .....	84
Amfotericina B.....	84
Miltefosina .....	87
Amminosidina .....	91
Pentamidina .....	92
Domperidone .....	93
Azoli.....	96
Enrofloxacin.....	97
Aztromicina .....	98
Trattamento contro la Leishmaniosi cutanea .....	98
VACCINI .....	100
Immunologia .....	101
Leishmune .....	107
LeishTec.....	107
CaniLeish .....	108
Letifend .....	110
Problematiche .....	111
CONCLUSIONE .....	112
BIBLIOGRAFIA.....	114

SITOGRAFIA ..... 123

## RIASSUNTO

La leishmaniosi canina, causata da un protozoo del genere *Leishmania* (ordine Kinetoplastida, famiglia Trypanosomatidae), è una malattia infettiva zoonotica. Nei Paesi del bacino del Mediterraneo, l'agente eziologico di questa malattia è *Leishmania infantum* che presenta una forma promastigote che viene veicolata da insetti del tipo *Phlebotomus spp.* e una forma amastigote che colpisce varie specie di vertebrati. Il principale serbatoio di *L. infantum* è il cane domestico mentre gli esseri umani sono solo ospiti occidentali.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di effettuare una ricerca approfondita della letteratura sulla leishmaniosi viscerale canina e di descrivere le lesioni cutanee che ne rappresentano le manifestazioni cliniche più comuni, la prevenzione, i farmaci utilizzati e i vaccini presenti in commercio.

## ABSTRACT

Canine leishmaniasis, caused by a protozoan of the genus *Leishmania* (order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae), is a zoonotic infectious disease. In the countries of the Mediterranean basin, the aetiological agent of this disease is *Leishmania infantum*, which has a promastigote form that is carried by insects such as *Phlebotomus spp.* and an amastigote form that affects various vertebrate species. The main reservoir of *L. infantum* is the domestic dog while humans are only western hosts.

The aim of this work was to conduct a thorough literature search on canine visceral leishmaniasis and to describe the cutaneous lesions that represent its most common clinical manifestations, its prevention, the drugs used and the vaccines available on the market.

# INTRODUZIONE

Leishmaniosi è un termine globale utilizzato per indicare malattie cutanee e viscerali, sia antroponotiche sia zoonotiche, causate da protozoi del genere *Leishmania*, un gruppo eterogeneo di parassiti trasmessi tra mammiferi attraverso la puntura di artropodi vettori (flebotomi o pappataci) ematofagi.

Una varietà di animali costituiscono i serbatoi naturali e includono sia cani domestici che selvatici, roditori, volpi, sciacalli, lupi, procioni, iraci, bradipi, oritteropi, opossum e roditori come ratti e topi. In Paesi come l'India, l'uomo è considerato il principale serbatoio.

Nel complesso, ad oggi conosciamo più di 20 specie di *Leishmania* in tutto il mondo e le diverse forme di malattia sono correlate alla specie di *Leishmania* infettante e all'interazione tra formazione genetica e stata immunitaria dell'ospite (McGwire et Satoskar, 2013) (Tabella 1).

Sebbene le diverse specie di *Leishmania* risultino morfologicamente molto simili, esse causano due forme cliniche principali, leishmaniosi cutanea (CL) e leishmaniosi viscerale (VL), a seconda di quali tipi di cellule fagocitarie vengono invase. Nella CL, i parassiti infettano i macrofagi residenti nella pelle; nella VL, invece, vengono infettati fegato, milza, midollo osseo, linfonodi e intestino.

La forma più comune di leishmaniosi è la CL con 0,7-1,2 milioni di nuovi casi che si verificano ogni anno in tutto il mondo (Okwor et Uzonna, 2016). La CL si presenta in tre forme diverse:

- leishmaniosi cutanea localizzata (LCL),
- leishmaniosi cutanea diffusa (DCL) e
- leishmaniosi mucocutanea (MCL).

Leishmania (L) species	Sandfly vector (Phlebotomus [P] or Lutzomyia [L]) species	Main affected areas	Reservoir	Disease manifestations
<i>L. aethiopica</i>	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	Ethiopia, Kenya	Hyraxes	Cutaneous, diffuse, mucosal
<i>L. amazonensis</i>	<i>L. flaviscutellata</i>	East Andes	Rodents	Cutaneous, disseminated
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. ovallesi</i> <i>L. wellcomei</i> <i>L. neivai</i> <i>L. whitmani</i>	East and West Andes	Rodents, marsupials, dog	Cutaneous, mucosal
<i>L. donovani</i>	<i>P. argentipes</i> <i>P. martini</i> <i>P. orientalis</i>	India, Bangladesh, Nepal Bhutan Sudan, Ethiopia	Human	Visceral
<i>L. guyanensis</i>	<i>L. umbratilis</i>	East Andes	Arboreal edentate mammals Dog	Cutaneous, mucosal Visceral, cutaneous
<i>L. infantum</i> (same as <i>L. chagasi</i> in the New World)	<i>P. ariasi</i> <i>P. perniciosus</i>	Mediterranean region	Dog	Visceral, cutaneous
<i>L. major</i>	<i>L. longipalpis</i> <i>P. duboscqi</i> <i>P. papatasi</i>	Latin America Sub-Saharan Africa North Africa, Middle East Iran, Pakistan, India	Rodents Gerbils, Rodents	Cutaneous
<i>L. mexicana</i>	<i>L. olmeca olmeca</i>	West Andes	Rodents, marsupials	Cutaneous, diffuse, mucosal
<i>L. panamensis</i>	None proven	West Andes	Arboreal edentate mammals	Cutaneous, mucosal
<i>L. peruviana</i>	None proven	Peru	Rodents, marsupials, dog	Cutaneous, mucosal
<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i> <i>P. arabicus</i> <i>P. guggisbergi</i>	North Africa, Middle East, Iran, Afghanistan North and sub-Saharan Africa	Human Hyraxes	Cutaneous

Tabella 1: Manifestazioni di malattia e trasmissione delle specie di *Leishmania* predominanti nel Nuovo e Vecchio Mondo  
 Il genere *Leishmania*, composto da protozoi tripanosomatidi appartenenti all'ordine Kinetoplastida, abbraccia più di 20 specie diverse. La variazione geografica tipo/i di specie esiste tra paesi endemici caratteristici con un clima subtropicale.  
 La femmina del flebotomo, appartenente ai generi *Phlebotomus* nel Vecchio Mondo e *Lutzomyia* nel Nuovo Mondo, è l'unico vettore responsabile della trasmissione della leishmaniosi (Pace, 2014).

In tutto il mondo c'è una incidenza annuale stimata di 2 milioni di casi in 98 paesi, con altri 350 milioni di persone a rischio di infezione (Okwor et Uzonna, 2016).

Tuttavia, oltre il 90% dei nuovi casi si verifica in soli 13 paesi (Afghanistan, Algeria, Bangladesh, Bolivia, Brasile, Colombia, Etiopia, India, Iran, Perù, Sudan del Sud, Sudan e Siria) (Cantacessi et al, 2015). Si stima che tra 0,9 e 1,7 milioni di persone vengono infettate ogni anno, ma solo una piccola frazione di loro svilupperà la malattia e 20.000-30.000 ne muoiono (Steverding, 2017).

Nei Paesi tropicali questa malattia è perlopiù trascurata, ed è chiamata anche "malattia della povertà"; si verifica infatti in villaggi rurali remoti con abitazioni povere e dove vi è un precario accesso alle moderne strutture sanitarie, mettendo a dura prova le già scarse risorse finanziarie delle famiglie colpite, costrette a vendere i loro beni (terreni e bestiame) o ad accettare prestiti informali con pesanti tassi di interesse per pagare diagnosi e trattamento della Leishmaniosi.

Nonostante sia per lo più concentrata nei paesi poveri del Sud-Est Asiatico, Africa orientale e America Latina, la leishmaniosi è anche endemica in diversi Paesi del Mediterraneo, rendendo questa parassitosi una malattia importante per gli abitanti locali, così come per i viaggiatori. I viaggi internazionali negli ultimi decenni hanno incrementato i casi di Leishmaniosi anche nelle zone non endemiche, rendendo questa infezione importante da riconoscere.

## Storia

Il genere *Leishmania* si è evoluto in tempi antichissimi, nel Mesozoico, ancora prima della rottura del supercontinente Pangea (252-66 milioni di anni fa) (Steverding, 2017).

Tuttavia, l'origine geografica delle diverse specie di *Leishmania* è ancora dibattuta. Ad oggi vi sono 3 ipotesi attualmente discusse: ipotesi paleartica, neotropica e del supercontinente.

La prima ipotesi (Lysenko, 1971) suggerisce l'idea di una regione Paleartica, ovvero un'area che comprende Europa, Asia a nord dell'Himalaya, l'Arabia settentrionale e l'Africa a nord del Sahara, nel Paleocene. Quest'ipotesi è sostenuta dalla scoperta di fossili che mostrano l'evoluzione dei flebotomi ancestrali e dei roditori muridi in questa zona durante il Paleocene. Probabilmente i roditori offrivano le loro tane caratterizzate da alta umidità e un luogo al riparo dalle basse temperature alle mosche della sabbia.

Inoltre, vi sono altre prove della regione tropicale (che comprende l'America meridionale e centrale, il Messico meridionale, le isole dei Caraibi e la Florida meridionale), nel Miocene prima del sollevamento dell'istmo di Panama: soprattutto a causa dell'innalzamento delle temperature, i flebotomi, insetti vettori di *Leishmania*, hanno iniziato a popolare le foreste; pertanto, mammiferi arboricoli divennero nuovi ospiti di *Leishmania*. Il cambiamento climatico e l'adozione di nuovi ospiti da parte del vettore può spiegare la maggiore diversità di *Leishmania* nel Nuovo Mondo rispetto al Vecchio Mondo.

La seconda ipotesi è quella neotropica, suggerita per la prima volta da Lainson & Shaw nel 1987 e ulteriormente elaborata da Noyes nel 1998. Si pensa che la maggiore diversità di *Leishmania* del Nuovo Mondo rispetto a quella del Vecchio Mondo era la prova di un'origine neotropica delle specie. *Leishmania* nel Nuovo Mondo può essere attribuita all'evoluzione accelerata nella regione neotropica a causa del cambiamento climatico, dell'aumento di ospiti e dell'isolamento geografico. I bradipi potevano essere considerati come primo ospite vertebrato per *Leishmania* e durante l'Eocene il parassita si è adattato ai porcospini.

Nel 2000, Momen & Cupolilli hanno fornito una terza ipotesi suggerendo che con la rottura del supercontinente nel Mesozoico i sottogeneri *Leishmania* e *Sauroleishmania* si sono evoluti in Africa mentre il sottogenere *Viannia* si è sviluppato in Sud America.

Il sottogenere *Leishmania* comprende tutte le specie del Vecchio Mondo (*L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*). Poiché *L. aethiopica* si ritrova solo in Etiopia e in Kenya, si è ipotizzato che questa specie abbia avuto origine in Africa. Sulla base dell'habitat ristretto del sistema roditori Arvicantes-insetti vettori *Phlebotomus* nell'Africa subsahariana, si è supposto che *L. major* abbia avuto origine in questo continente.

Poiché gli esseri umani si sono evoluti in Africa orientale, è stato suggerito che la diffusione di *L. tropica* potrebbe aver avuto origine in questa parte dell'Africa. In accordo con la prima ipotesi è stato postulato che la specie del Nuovo Mondo *L. mexicana*, che condivide molte

caratteristiche con *L. major*, si sia dispersa nella regione nearctica (America Settentrionale, area settentrionale del tropico del Cancro e Groelandia) insieme ai suoi ospiti roditori durante l'Eocene. Successivamente in Sud America, fattori climatici ed ecologici, probabilmente hanno causato un'ulteriore speciazione dando origine a *L. venezuelensis*, *L. amazonensis* e *L. waltoni*. *Leishmania chagasi*, un'altra specie del Nuovo Mondo, è nel frattempo considerata sinonimo di *L. infantum* che è stata portata in Sud America in tempi storici (circa 500 anni fa dai coloni europei o dai loro cani). Per quanto riguarda il sottogenere *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. naffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. shawi*), che si presenta esclusivamente neotropicale, è stato ipotizzato (Steverding, 2017) che queste specie si siano evolute in Sud America dopo la separazione del Gondwana (il supercontinente che si ritiene sia esistito tra 660 e 290 milioni di anni fa). L'ipotesi del supercontinente riflette molto meglio i dati filogenetici molecolari disponibili ed è stata recentemente confermata dalla ricostruzione filogenetica utilizzando nuovi metodi bioinformatici (SISRS, Site Identification da brevi sequenze di lettura) per identificare oltre 200.000 siti informativi in tutto il genoma dal nuovo sequenziamento e da dati di *Leishmania* disponibili al pubblico. Durante la separazione del Gondwana, il genere *Leishmania* è stato diviso nel sottogenere *Viannia* in Sud America e nei sottogeneri *Leishmania*, *Mundinia* e *Sauroleishmania* in Africa. L'assenza di infezioni da *Leishmania* in rettili del Nuovo Mondo e la vicinanza filogenetica dei sottogeneri *Leishmania* e *Sauroleishmania* è probabilmente un'indicazione che *Sauroleishmania* rappresenta una linea di mammiferi che successivamente si è adattata ai rettili. Infine, nell'Eocene, una specie del sottogenere *Leishmania* si diffuse dall'Asia al Vicino Oriente insieme ai suoi ospiti roditori attraverso il ponte di Beringe si è evoluta nelle specie americane di *Leishmania*.

Ci sono descrizioni di lesioni che ricordano questa malattia cutanea su tavolette nella biblioteca del re assiro Ashurbanipal del VII secolo a.C.. Si pensa anche che siano stati derivati da testi precedenti che risalgono almeno a mille anni prima.

Uno studio su mummie egiziane provenienti da una tomba del Medio Regno a Tebe (2050-1650 a.C.) ha trovato il DNA mitocondriale di *Leishmania* in quattro esemplari. Il sequenziamento diretto del frammento di DNA ha rivelato che le quattro mummie erano infettate da *L. donovani*, suggerendo che la VL era presente nell'antico Egitto.

La leishmaniosi è anche menzionata nel Papiro Ebers, una raccolta di antichi documenti medici egiziani risalenti al 1500 a.C.: questo documento riporta una condizione della pelle, conosciuta in inglese come "Nile Pimple", che presumibilmente si riferisce alla CL.

Utilizzando l'analisi immunologica, i macrofagi infetti da *Leishmania* sono stati rilevati in una mummia peruviana di una bambina di 6 anni datata dall'800 a.C..

Inoltre, durante l'antichità le antiche società arabe erano convinte che gli individui con piaghe potessero essere guariti da ulteriori infezioni. Questa intuizione fu usata dalle popolazioni del Medio Oriente e dell'Asia centrale per l'immunizzazione attiva contro le piaghe orientali. Essi inoculavano essudati da lesioni attive nelle natiche dei bambini o esponevano il sedere dei bambini ai flebotomi per prevenire lo sviluppo di cicatrici facciali deturpanti.

La società e gli scienziati arabi furono i principali rappresentanti nella descrizione della CL durante il Medioevo. La prima descrizione di piaghe cutanee fu fatta nel 930 dal medico e scienziato persiano Rhazes nella regione di Baghdad; più tardi anche il grande filosofo e medico persiano Avicenna (980-1037) parlò di una condizione dermica, conosciuta anche

come "Balkh dolente" nel nord Afghanistan, corrispondente a lesioni cutanee secche causate da *L. tropica*.

Nel Nuovo Mondo, condizioni facciali deturpanti che ricordano la MCL sono raffigurate sulle ceramiche precolombiane dal V secolo. Inoltre, quattro crani femminili risalenti all'XI secolo furono scoperti in un cimitero archeologico nel deserto di San Pedro de Atacama del Cile settentrionale ed hanno fornito prove morfologiche e molecolari della leishmaniosi in Sud America. La presenza della leishmaniosi ad alta quota (si noti che il deserto di Atacama è 2400 m sul livello del mare) dove la malattia normalmente non si trova, è stata spiegata con la migrazione di persone di pianura infettate dalla malattia verso l'altopiano desertico.

Dal 16° secolo in poi, diversi resoconti di infezioni cutanee di piaghe sono state registrate in vari luoghi del Medio Oriente. Nel 1756, il medico e naturalista scozzese Alexander Russell (1715-1768) pubblicò un dettagliato resoconto clinico della popolazione locale in cui distingueva una forma "maschile" e una "femminile" della malattia, che molto probabilmente corrispondono alla CL zoonotica umida causata da *L. major* e alla CL antropotonica secca causata da *L. tropica*, rispettivamente.

Con la colonizzazione spagnola delle Americhe all'inizio del 16° secolo, apparvero rapporti di conquistadores che descrivevano condizioni facciali sfiguranti del viso che ricordano la MCL. Uno dei primi resoconti fu dato dal cronista spagnolo Pedro Pizarro (1515-1602) nel 1571: scrisse di coltivatori di coca che lavoravano nelle basse pendici orientali delle Ande peruviane che soffrivano della distruzione del naso e delle labbra.

Non ci sono rapporti convincenti sulla VL prima del XIX secolo. Una delle prime descrizioni sul Kala-azar (Leishmaniosi-viscerale umana) fu del chirurgo militare William Twining (1790-1835) quando pubblicò un articolo nel 1827 sui pazienti del Bengala (India), che apparivano deperiti con ingrossamento di milza, anemia acuta e febbre intermittente.

Nel 1832, Twining pubblicò un libro in cui descrisse in dettaglio i sintomi, tra cui l'aspetto secco e squamoso della pelle. Il primo focolaio di Kala-azar era già stato registrato nel 1824 nel villaggio di Mahomedpore, trenta miglia a est di Jessore nel Basso Bengala, India. Da lì, la malattia si diffuse verso ovest e raggiunse Burdwan nel Bengala occidentale. Il Kala-azar divenne epidemico e si diffuse nel nord del Bengala e nell'Assam negli anni seguenti. La mortalità dei pazienti di Kala-azar nelle aree colpite è stata segnalata fino a circa il 30%. La malattia rimase endemica in molte aree per i decenni successivi. La parola Kala-azar è stata coniata alla fine del 19° secolo e letteralmente significa 'malattia della schiena'. La denominazione della malattia come Kala-azar si riferisce allo scolorimento grigiastro della pelle delle persone di colore chiaro nel corso dell'infezione.

Già nel 1885 il medico scozzese David Douglas Cunningham (1843-1914) vide gli amastigoti (vedi ciclo biologico pag. 15 di *Leishmania* in una lesione cutanea (Delhi boil, traducibile come "foruncolo di Delhi"). Successivamente, il medico dell'esercito russo Piotr Fokich Borovsky (1863-1932) fu il primo a riconoscere che nelle lesioni di queste piaghe orientali erano presenti dei protozoi. Ma a causa della pubblicazione delle sue scoperte in un giornale poco conosciuto, la sua osservazione passò inosservata.

Nel novembre 1900, il patologo scozzese William Boog Leishman (1865-1926, Figura 1), che serviva l'esercito britannico in India, scoprì corpi ovoidali nella milza di un soldato morto per cachessia e splenomegalia mentre era a DumDum, nei pressi di Calcutta. Successivamente,

egli trovò corpi simili in un ratto bianco infettato sperimentalmente e pubblicò le sue scoperte nel 1903, dove suggerì che i corpi ovoidali erano forme degenerate di tripanosomi.



Figura 1: Tenente generale Sir William Boog Leishman. Il genere *Leishmania* prende il nome dal patologo scozzese che è accreditato insieme a Charles Donovan per la scoperta del parassita che causa della leishmaniosi viscerale (VL). Foto Wellcome Library, Londra, usata secondo la licenza Creative Commons Attribution solo CC BY 4.0 (Steverding, 2017)

Poche settimane più tardi, il medico irlandese Charles Donovan (1863-1951), professore di fisiologia al Madras Medical College, pubblicò un articolo in cui riferiva di aver trovato corpi simili in campioni splenici prelevati durante la vita e all'autopsia da soggetti nativi indiani con febbre remittente e milza ingrossata. Poiché Donovan non pensava che i corpi ovoidali fossero tripanosomi degenerati, inviò un vetrino del parassita al biologo francese Félix Étienne Pierre Mesnil (1868-1938) a Parigi chiedendogli di mostrare l'esemplare al suo connazionale Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922), il quale pensò che si trattasse di un nuovo parassita. Nel frattempo, il medico britannico Ronald Ross (1857-1932), a cui fu ordinato dal governo indiano nel 1898 di indagare sul Kala-azar, pubblicò un articolo nel 1903 commentando la scoperta dei corpi ovoidali trovati da Leishman e Donovan nella milza di pazienti con piressia cronica e splenomegalia e concluse che i corpi ovoidali non erano tripanosomi degenerati ma un nuovo protozoo e che il quadro clinico dei casi assomigliava a quello del Kala-azar. In un documento di follow-up, Ross, anche in disaccordo con Laveran, propose di chiamarli *Leishmania donovani*. La discussione sulla natura dei corpi di Leishman continuò per un altro anno ma alla fine del 1904 il termine *Leishmania donovani* fu generalmente adottato. La specie affine che causa la VL *Leishmania infantum* fu descritta per la prima volta dal batteriologo francese

Charles Jules Henry Nicolle (1866-1936) in bambini in Tunisia affetti da anemia splenica nel 1908. Nello stesso anno, insieme al suo collega Charles Comte (1869-1943), trovò il parassita anche nei cani, a Tunisi. Da allora, i cani sono stati implicati come importanti ospiti serbatoio per la VL. Come già menzionato sopra, Cunningham e Borovsky furono i primi a vedere i parassiti, ma fu il patologo americano James Homer Wright (1869-1928) ad essere accreditato per la scoperta di *L. tropica*. Nel 1903, pubblicò una dettagliata descrizione dell'organismo da un campione di una piaga di una ragazza armena e chiamò il parassita *Helcosomai tropicum*. Nel 1906, il medico e zoologo tedesco Max Lühe (1870-1916) cambiò il nome in *Leishmania tropica*. Nel 1914, i medici russi Wassily Larionovich Yakimoff (1870-1940) e Nathan Isaakovich Schokhor (1887-1941) suggerirono che *L. tropica* doveva essere divisa nelle due sottospecie *L. tropica minore* e *L. tropica major* in base alle dimensioni dei parassiti trovati nelle lesioni cutanee (amastigoti più piccoli nella prima specie). Questa classificazione di *L. tropica* divenne lo standard per i successivi 60 anni.

Nel frattempo, si scoprì che le due sottospecie di *L. tropica* erano associate a due tipi di lesioni e differenze di epidemiologia: *L. tropica minor* è stata delineata come causa di lesioni nodulari secche in ambienti urbani, mentre *L. tropica major* è stata scoperta produrre lesioni ulceranti umide e apparire nelle regioni rurali. Sulla base di queste differenze, Bray et al. (1973) hanno proposto di classificare le due sottospecie come *L. tropica* e *L. major*, rispettivamente. Nella stessa pubblicazione hanno riportato la scoperta di una nuova specie di *Leishmania* che causa una forma diversa di CL in Etiopia: *L. aethiopica*.

Le Leishmanie del Nuovo Mondo sono state descritte per la prima volta dal medico brasiliano Adolpho Carlos Lindenberg (1872-1944) e dal medico italiano Antonio Carini (1872-1950) insieme al suo collega brasiliano Ulysses de Freitas Paranhos (1880-1954), come responsabili di lesioni cutanee in pazienti con "ulcere di Baurú" nello Stato di São Paulo (Brasile) nel 1909. Due anni dopo, il medico e batteriologo italiano Alfonso Splendore (1871-1953) trovò il parassita nelle lesioni mucocutanee in alcuni pazienti. Inizialmente si pensava che i parassiti del Nuovo Mondo fossero identici a *L. tropica*. Ma nel 1911, il clinico e scienziato brasiliano Gaspar de Oliveira Vianna (1885-1914) studiando campioni ottenuti da una lesione cutanea di un paziente residente a São João de Além Paraíba, Minas Gerais, concluse che il parassita era diverso da *L. tropica*: basò la sua decisione su apparenti differenze morfologiche e chiamò la nuova specie *Leishmania brazilienses*. Sebbene *L. peruviana* fosse già stata descritta nel 1913, tutte le altre specie di *Leishmania* del Nuovo Mondo che causano LCL e MCL sono state caratterizzate molto più tardi: *L. mexicana* nel 1953, *L. guyanensis* nel 1954, *L. amazonensis* e *L. panamensis* nel 1972, *L. venezuelensis* nel 1980, *L. lainsoni* nel 1987, *L. naffi* e *L. shawi* nel 1989, *L. lindenbergi* nel 2002 e *L. waltoni* nel 2015.

Un'altra specie che in precedenza era associata alla leishmaniosi nell'uomo e negli animali in Colombia e Panama, *L. colombiensis*, è stata recentemente riclassificata come *Endotrypanum colombiensis*. Poiché Aristides Marques da Cunha (1887-1949) e Evandro Serafim Lobo Chagas (1905-1940), per ragioni sconosciute, non furono in grado di infettare subito gli animali da laboratorio con il parassita dai casi brasiliani di VL, essi pensavano di aver scoperto una nuova specie responsabile della VL nel Nuovo Mondo e la chiamarono *Leishmania chagasi* nel 1937. Tuttavia, un anno dopo, Cunha riferì di essere riuscito a infettare animali con colture isolate da casi di VL americana e quindi concluse che l'agente della VL in America Latina era identico

a *L. infantum*. Più recentemente, questa nozione è stata supportata dalle moderne tecniche di analisi molecolare che dimostrano che i ceppi di *L. chagasi* non possono essere distinti dai ceppi di *L. infantum*.

L'effettiva modalità di trasmissione attraverso la puntura del flebotomo fu infine dimostrata dal parassitologo britannico-israeliano Saul Adler (1895-1966) nel 1941, quando infettò con successo cinque volontari con *L. tropica* in laboratorio. Un anno dopo, venne anche definitivamente dimostrato che i flebotomi (chiamati correttamente pappataci o, dalla traduzione inglese "mosche della sabbia") rappresentano il vettore del Kala-azar. Nel 1922, il medico brasiliano Henrique de Beaurepaire Rohan Aragão (1879-1956) dimostrò che i flebotomi sono responsabili della trasmissione della leishmaniosi in Sud America. Più tardi si scoprì che tali insetti trasmettono la leishmaniosi nel Nuovo Mondo e che risultano appartenere al genere *Lutzomyia*. Nel frattempo, 42 specie appartenenti al genere *Phlebotomus* e 56 specie al genere *Lutzomyia* sono state implicate nella trasmissione della leishmaniosi nel Vecchio e nel Nuovo Mondo (Maroli et al, 2013).

Dalla storia della leishmaniosi è chiaro che l'evoluzione della malattia è intrinsecamente legata all'attività umana. Anche se la malattia probabilmente già colpiva i primi ominidi, la leishmaniosi non è stata un fattore di selezione nell'evoluzione dell'uomo come lo è stata, per esempio, la tripanosomiasi africana. Tuttavia, la leishmaniosi è stata diffusa in tutto il mondo dall'uomo durante le prime migrazioni. Inoltre, i cani addomesticati, uno dei principali ospiti per la VL, sembrano aver giocato un ruolo importante nell'epidemiologia iniziale della malattia (Steverding, 2017).

Le ricerche più recenti hanno dimostrato che nuove specie di *Leishmania* patogene per l'uomo devono ancora essere scoperte. L'emergenza di nuove forme è probabilmente legata all'attività umana all'interno dei boschi (Walsh et al, 1993). Questo porta le persone a più stretto contatto con i flebotomi, che di solito si nutrono su animali selvatici. Infatti, la deforestazione e la penetrazione delle foreste da parte dell'uomo possono portare all'adattamento dei flebotomi a nutrirsi sulle persone e sui loro animali domestici vicino alle abitazioni e agli insediamenti umani.

## Obiettivi della Tesi

Dopo avere definito cosa si intende per *Leishmania* e leishmaniosi, e descritta la distribuzione geografica di questa malattia e delle sue possibili manifestazioni, fornire un quadro più dettagliato della infezione da *L. infantum* in Italia, trattando in particolare gli aspetti epidemiologici (fattori legati all'ambiente, ai potenziali ospiti vertebrati, alla presenza e distribuzione dei vettori competenti), profilattici e terapeutici, un'ottica One Health di tutela della salute umana e animale.

# Leishmania infantum

## BIOLOGIA

La Leishmaniosi canina (LCan) è causata prevalentemente da *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), un protozoo caratterizzato dalla presenza di un evidente organello mitocondriale detto kinetoplasto. Gli insetti vettori, i flebotomi, il cui colore varia dal nero al bianco, sono ematofagi e hanno una lunghezza di circa 2-3 mm. Sono ascritti all'ordine Diptera, sottordine Nematocera della famiglia Psychodidae e sottofamiglia Phlebotominae. Subiscono metamorfosi completa, o olometabola, ovvero il loro ciclo di vita comprende quattro fasi di sviluppo: uovo, larva (quattro stadi), pupa e adulto (Cabral et al, 1992). Le caratteristiche morfologiche degli adulti (Figura 2) sono:

- corpo di colore giallo-pallido o giallo-ruggine, piccolo, lungo circa 2-3  $\mu\text{m}$ , coperto da lunghi e fitti peli;
- torace (composto da tre segmenti) e addome formano un angolo quasi retto, che li rende riconoscibili anche ad occhio nudo;

L'addome è costituito, invece, da dieci segmenti, di cui i terminali (3 nella femmina e 4 nel maschio) sono trasformati nell'apparato genitale. Nella femmina il nono, urite, si differenzia in una furca che circonda l'apertura genitale ed il decimo segmento è ridotto a due appendici articolari (cerci) fra i quali sbocca l'apertura anale. Nel maschio il settimo e ottavo urite sono invaginati l'uno nell'altro, mentre il nono e il decimo segmento sono completamente modificati e costituiscono la parte genitale (Young et al., 1994).

- testa allungata ed inserita sul collo in modo da formare un angolo di 45°;
- apparato boccale delle femmine, pungente e succhiatore, formato da: labrum-epifaringe (scanalato centralmente e denticolato alla sua estremità), due mandibole seghettate, due mascelle a forma di lama (mascella e mandibola sono predisposte ad incidere la cute), ipofaringe (che porta il dotto salivare), il tutto contenuto, in condizioni di riposo, dentro il labbro inferiore (labium).
- occhi composti, voluminosi, di colore scuro, situati ai lati della testa (appaiono rotondeggianti se visti di profilo e reniformi dorsalmente);
- palpi (appendici articolate in collegamento con l'apparato buccale aventi funzione sensoriale) pelosi e ricurvi;
- proboscide corta e diretta in basso;
- antenne lunghe, pelose, costituite da 16 segmenti o articoli (alcuni di questi fungerebbero da organi di senso);
- ali grandi, pure pelose, di forma subovale.



1. *Figura 2. Flebotomo*

(<https://www.salute.gov.it/portale/sanitaAnimale/dettaglioContenutiSanitaAnimale.jsp?lingua=italiano&id=220&tab=2>)

Nell'ospite vertebrato, *Leishmania* (Figura 3) appare come un parassita intracellulare dei macrofagi e delle cellule dendritiche e si presenta come un organismo immobile, rotondeggiante od ovoidale, nel quale possono essere individuati:

- il protoplasma granuloso e omogeneo, delimitato, nella zona periferica, da un plasmalemma tristratificato;
- il grosso nucleo sferico centrale o eccentrico;
- il cinetoplasto (costituito da DNA extranucleare) piriforme o a bastoncino, spesso situato alla periferia del corpo parassitario ed in posizione antinucleare (spesso perpendicolare al nucleo);
- il rizoplasto, abbozzo di flagello, che si diparte in prossimità del cinetoplasto da un corpo basale o blefaroplasto e termina, senza esteriorsi, alla periferia della cellula protozoaria, circoscritto, nel suo breve percorso, da un manicotto citoplasmatico rivestito dal plasmalemma, che si invagina profondamente in modo da costituire, attorno al rizoplasto stesso, una tasca flagellare aperta verso l'esterno (Solano et al., 2000).

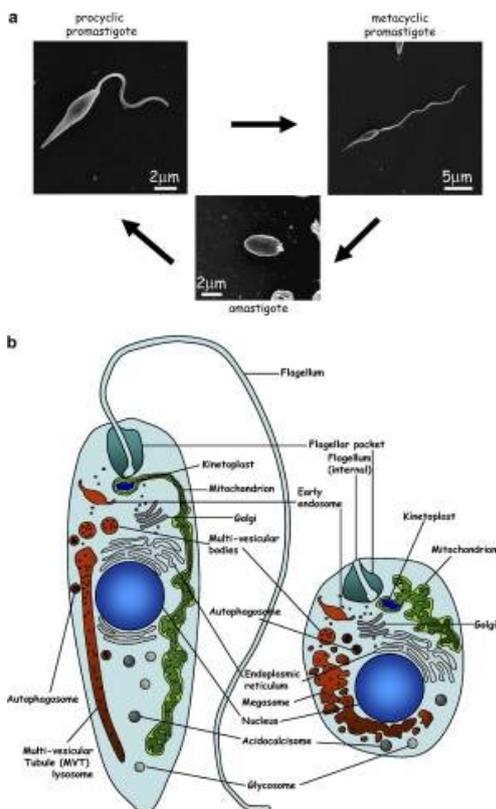


Figura 3: Rappresentazione schematica della *Leishmania* spp. con l'evidenza della forma e del proprio contenuto. A sinistra è rappresentata la forma promastigote, a destra la forma amastigote (Sébastien Besteiro et al., 2007).

Le forme flagellate del parassita (Figura 4), dette promastigoti, si moltiplicano nell'intestino dell'insetto vettore, la femmina del flebotomo, che le inocula nella sede intradermica

dell'ospite durante il pasto di sangue. I macrofagi del connettivo e altre cellule fagocitarie mononucleate fagocitano i promastigoti, i quali assumono una forma tondeggianti e non flagellata (definita amastigote). Nel macrofago si ha la fusione del fagosoma con il lisosoma e si forma il fagolisosoma: all'interno di esso *Leishmania* viene esposta a fattori che tentano di distruggerla; ciò però non sortisce nessun effetto perché la parete dell'amastigote contiene glicoproteine resistenti agli enzimi e ai metaboliti del macrofago (Ferroglio et al, 2007).

In questa sede, il protozoo si moltiplica per scissione binaria fin quando, il macrofago, pieno di parassiti, si rompe per lisi cellulare. Gli amastigoti vengono così liberati e possono invadere altre cellule del sistema reticolo-endoteliale. Questo meccanismo permette la diffusione dell'infezione dal luogo della puntura verso le mucose o verso organi ricchi di macrofagi quali: fegato, milza e midollo osseo. Gli amastigoti si ritrasformano in promastigoti flagellati dopo essere stati ingeriti dai flebotomi a seguito di un pasto di sangue.

Solo nei vettori competenti, i promastigoti di *Leishmania* si attaccano all'epitelio dell'intestino, si moltiplicano e differenziano in una forma infettiva metaciclica, che viene trasmessa al mammifero ospite. L'ancoraggio dei promastigoti all'intestino medio dell'insetto è essenziale per il completamento del loro ciclo di vita al fine di evitare l'escrezione quando il flebotomo defeca (Killick-Kendrick et al., 1999; Sacks, 2001).

Ricapitolando, due forme morfologiche principali sono identificate nel ciclo di vita del protozoo *Leishmania*:

- una extracellulare: un promastigote flagellato lungo 15-20  $\mu\text{m}$  all'interno del flebotomo
- e un amastigote intracellulare obbligato lungo 3-5  $\mu\text{m}$ , non flagellato, all'interno delle cellule (monocita-macrofago) dell'ospite mammifero.

La durata del ciclo biologico del parassita nell'ospite invertebrato varia da un minimo di 4 giorni ad un massimo di 20, in relazione alle condizioni climatiche esterne (Desjeux, 2001). La disseminazione del parassita nell'organismo e l'eventuale sviluppo della malattia dipendono dal tipo e dall'efficienza della risposta immunitaria dell'ospite.

Le femmine si nutrono di sangue durante la mattina presto, la sera e la notte, ma possono pungere anche durante il giorno se vengono disturbate; possono sopravvivere anche in ambienti secchi; inoltre, diventano attive nelle ore più buie, quando la temperatura scende e l'umidità aumenta.

Dopo un pasto di sangue, la femmina depone da 30 a 70 uova, spargendole in un luogo adatto alla riproduzione. Entro una o due settimane, le uova si schiudono. Le larve si nutrono di materiali organici. Si trovano nelle foglie e in ambienti umidi che contengono sostanze organiche, come le grotte, tane e rifugi di animali e crepe nei muri e nelle rocce. Se la temperatura scende, il quarto stadio della larva entra in diapausa. Lo stadio pupale dura da cinque a dieci giorni (Killick-Kendrick R. et al., 1999).

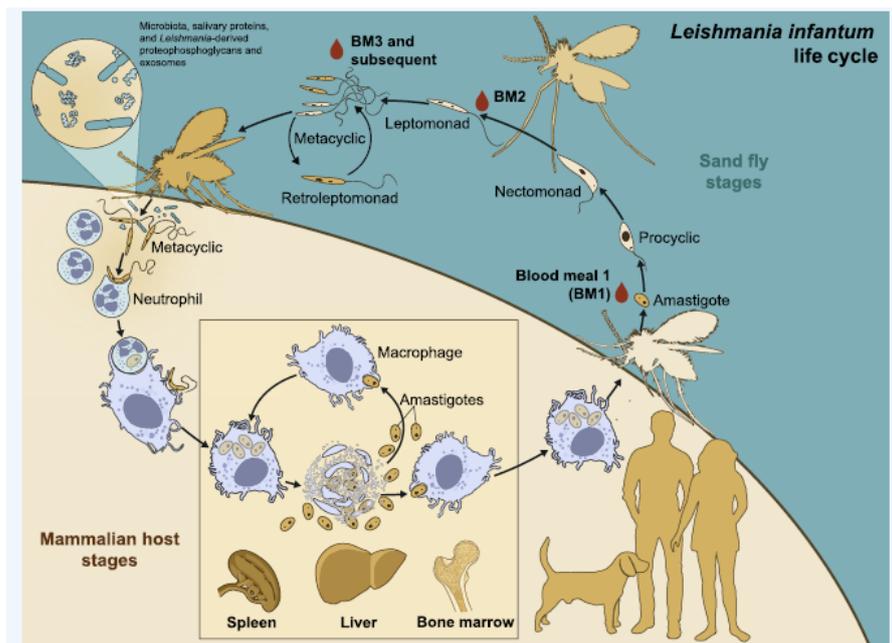


Figura 4: Ciclo vitale di *Leishmania infantum* (Serafim et al, 2019)

## SERBATOI DEL NOSTRO PAESE

*Leishmania infantum* è un protozoo dixeno, ovvero completa il ciclo in 2 ospiti: un ospite intermedio invertebrato, costituito dal flebotomo (che trasmette la forma flagellata infettiva) e un ospite rappresentato da un mammifero vertebrato (dove si sviluppa e si replica). Può colpire pertanto sia il cane, che rappresenta il serbatoio preferenziale dell'infezione, sia l'uomo (Sacks et Perkins, 1984).

I flebotomi tendono a sondare più volte lo stesso ospite, un metodo adattivo che aumenta la trasmissione.

La trasmissione zoonotica avviene:

- in cicli domestici, in cui il cane è ritenuto il serbatoio principale,
- o in cicli silvestri, in particolare in aree geografiche. In Italia l'impatto epidemiologico di canidi selvatici, come la volpe, è da ritenersi poco rilevante.

Le infezioni da *Leishmania* hanno tre caratteristiche patogenetiche:

- il bersaglio del parassita è rappresentato dai macrofagi, all'interno dei quali il parassita si può replicare;
- la comparsa e l'evoluzione della malattia dipendono dalla risposta immunitaria o infiammatoria dell'ospite;
- la persistenza dell'infezione nei tessuti (Oliva et al, 2006).

## DIFFUSIONE

Le specie italiane di flebotomi appartengono a due generi, *Phlebotomus* e *Sergentomyia*. Quest'ultimo è rappresentato dalla sola specie *S. minuta* che punge animali a sangue freddo e non riveste quindi importanza sanitaria; le altre specie, del genere *Phlebotomus*, sono: *P. perniciosus*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus*, *P. sergenti*, *P. ariasi*, *P. mascitti*, *P. papatasi* (Maroli et al., 1987). Da studi effettuati sul territorio italiano (Maroli et al., 1994), il flebotomo più diffuso risulta essere *P. perniciosus*, una specie antropofila e zoofila, che risulta presente in ambiente domestico (prevalenza 65,6%), ma che è reperibile anche in ambienti silvestri distanti dalle abitazioni (prevalenza 21,8%). In Italia questa specie è il vettore provato della leishmaniosi viscerale umana e della leishmaniosi canina.

*P. perfiliewi*, invece, appare frequente solo negli ambienti domestici ed è il vettore più probabile della leishmaniosi cutanea dell'uomo (Maroli et al., 1987). *P. neglectus*, sospettato di trasmettere la leishmaniosi viscerale e la leishmaniosi canina, veniva segnalato fino ad alcuni anni fa solo in aree limitate dell'Italia meridionale, ma recentemente è stato reperito anche in alcuni focolai del nord Italia (Gradoni et al., 2004).

Nei focolai di LCan del Mediterraneo, le prevalenze d'infezione variano tra 2 e 40%. Gli studi sulla presenza di immunità specifica cellulo-mediata nei confronti di *Leishmania* hanno evidenziato prevalenze più alte, a suggerire che il tasso d'esposizione è probabilmente molto più elevato. Nei focolai endemici del bacino del Mediterraneo i principali vettori appartengono alle specie *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus* e *P. tobbi*, tutte ad attività crepuscolare e notturna nel periodo dalla tarda primavera al tardo autunno (Bettini et al., 1986). Dal punto di vista epidemiologico, fino agli anni '80 tutte le regioni del nord Italia, esclusi alcuni territori della provincia di Bologna, erano indenni da LCan. A partire dagli inizi degli anni '90, si è verificato un aumento dell'incidenza di LCan in tutte le regioni endemiche e sono stati segnalati microfocolai di tipo stabile anche in aree tradizionalmente non endemiche, quali quelle del Piemonte, Valle d'Aosta, Lombardia, Trentino-Alto Adige, Veneto e Friuli-Venezia Giulia. Sembrerebbe quindi che l'endemia di LCan in Italia sia in rapida espansione verso latitudini settentrionali, costituendo, per queste aree, un problema emergente di sanità veterinaria (Pinelli et al., 1994).

Gran parte delle infezioni umane risulta a carico di individui immunocompetenti, sia bambini che adulti. Ad esse si aggiungono le co-infezioni di HIV-*Leishmania* che, seppure diminuite in incidenza grazie alle terapie HAART (Highly Active AntiRetroviral Therapy), costituiscono tuttora un grave problema sanitario per la difficile gestione dei pazienti altamente refrattari alle terapie. Numerosi sono anche i casi riportati nei pazienti organo-trapiantati. Il cane infetto da *L. infantum* costituisce l'unico serbatoio domestico della Leishmaniosi Viscerale Zoonotica (LVZ) (come detto in precedenza, in Italia l'impatto epidemiologico di canidi selvatici come la volpe è da ritenersi poco rilevante). L'elevata suscettibilità al parassita fa sì che il cane costituisca un eccellente indicatore della diffusione dell'infezione nel territorio. La leishmaniosi canina è diffusa in tutta la costa tirrenica, ionica ed adriatica fin sopra al Gargano e focolai importanti si riscontrano in tutte le isole maggiori e minori (Verso et al., 2003). In

pratica, oltre due terzi del territorio costiero, dal livello del mare a 4-600 metri di altitudine, rappresentano un sito potenziale di trasmissione. Tuttavia, grazie alla peculiare biologia dei vettori, la malattia non appare diffusa uniformemente sul territorio, ma distribuita a microfocolai ove le infezioni sono ricorrenti nel tempo e con percentuali di cani infetti che possono superare anche il 30% di quelli presenti nell'area in esame. Fino alla fine del secolo scorso, risultavano indenni tutte le regioni del Nord, con segnalazione di casi solamente in cani che avevano soggiornato precedentemente in zone infette. Purtroppo, questo non è più vero, dal momento che focolai autoctoni sono stati successivamente identificati anche in numerose zone settentrionali (Gaspari et al., 2017).

In uno studio condotto dall'Istituto Superiore di Sanità (Gradoni et al., 2004), l'intero territorio italiano è stato suddiviso nelle seguenti tre categorie:

❖ Territori pandemici

Esiste ormai la consolidata conoscenza della presenza endemica di leishmaniosi canina in tutti i territori costieri e collinari del versante tirrenico, ionico e del centro-sud Adriatico dell'Italia continentale (Liguria, Toscana, Lazio, Campania, Basilicata, Calabria, Puglia, Molise e Abruzzo) e delle isole maggiori e minori, con la sola esclusione dei quartieri centrali di grandi centri urbani.

❖ Territori endemo-sporadici, o per i quali non è nota l'effettiva distribuzione dell'infezione.

Appartengono a questa categoria le regioni costiere e collinari del medio versante adriatico (Marche ed Emilia-Romagna orientale) e quelle collinari dell'Umbria.

❖ Territori nei quali siano stati accertati solo più recentemente casi autoctoni di infezione.

Appartengono a questa categoria numerosi territori dell'Emilia-Romagna occidentale, Piemonte, Valle d'Aosta, Lombardia, Veneto, Trentino e Friuli. In queste regioni si ritiene che sia in atto una progressiva espansione dell'infezione canina, ma che tuttora il fenomeno sia limitato a focolai di piccola o media entità. L'aumento di incidenza e diffusione delle infezioni umana e canina sembrano tra loro correlati ed associati alla diffusione, attualmente ubiquitaria, del principale vettore di *L. infantum* in Italia, *P. perniciosus*.

All'origine della riemergenza della LVZ sembrano pertanto coinvolti più fattori concomitanti, tra i quali l'evoluzione del rapporto uomo-animale (incluso il randagismo) e le mutate condizioni climatico - ambientali. Al di là di misure già in atto per la lotta al randagismo, per contrastare il fenomeno non sono disponibili misure di controllo tradizionali, a causa di una serie di limitazioni di carattere scientifico e pratico:

- la mancanza di un vaccino ad uso umano o canino di comprovata efficacia (alcune formulazioni in fase di sperimentazione clinica nel cane mostrano ridotta azione profilattica);

- la relativa sporadicità dei casi umani, per la quale appare improponibile l'applicazione su larga scala di misure di lotta al vettore in ambienti antropizzati;
- l'estrema difficoltà a contrastare la diffusione geografica dei vettori mediante interventi sull'ambiente.

Si riscontra una maggiore proporzione di cani infetti asintomatici, rispetto alla numerosità dei casi clinicamente manifesti; pertanto, i cani non clinicamente infetti risultano essere i principali serbatoi del parassita.

L'importazione o la dispersione intercontinentale di vettori è improbabile perché i flebotomi non sono "robusti" come alcune zanzare e non sono noti per essere dispersi dal vento (Killick-Kendrick et al, 1990); inoltre, i vettori naturali della leishmaniosi del Vecchio Mondo sono già abbondanti nel Mediterraneo; la maggior parte dei flebotomi americani è ritenuta essere scarso vettore di *Leishmania* del Vecchio Mondo; e le specie di *Leishmania* native delle Americhe hanno ospiti che non si trovano in Europa (Lainson et al, 1994). Pertanto, *L. infantum* si riscontra nei cani portati nella regione mediterranea in vacanza o salvati da tali aree come randagi.

La deforestazione e l'urbanizzazione sono note per influenzare la leishmaniosi in tutto il mondo a causa delle associazioni di molti vettori e serbatoi con aree naturali o aree rurali.

In base ai risultati dei partner di EDEN (Emerging Diseases in a changing European Environment), la maggior parte delle regioni mediterranee ha almeno un vettore associato strettamente alle zone rurali o periurbane (Martinez et al, 2007). Dal 1945, la maggior parte dei cambiamenti socio-economici hanno favorito una riduzione della leishmaniosi viscerale infantile (causata da *L. infantum*) nell'Europa meridionale, tra cui una migliore nutrizione, l'uso di insetticidi, migliori alloggi e una riduzione della popolazione rurale. Gli ultimi vent'anni hanno visto cambiamenti che hanno aumentato il contatto con i vettori del Mediterraneo, tra cui più vacanze e seconde case per gli europei del nord, modalità di trasmissione impreviste (tra i consumatori di droghe tossicodipendenti) e immunosoppressione (coinfezioni di HIV/*Leishmania*); quest'ultima risulta essere più alta nel sud-ovest Europa (Desjeux et al, 2003).

## FATTORI FAVORENTI

I fattori e le cause favorevoli alla trasmissione e il contagio di Leishmaniosi sono il risultato di interazioni intricate tra il vettore (biomassa, specie, capacità vettoriale, comportamento, ecc.), l'ospite (biomassa, specie, età, razza, tipo di allevamento, misure di controllo), il parassita (biomassa, zimodemi) e fattori ecologici (la temperatura, l'igrometria, le nicchie ecologiche del vettore soprattutto negli stadi larvali, ecc.) (Chacara et al, 2008).

A causa della sua stretta relazione con gli esseri umani, il cane domestico è considerato il principale serbatoio di *L. infantum* in Cina, nel bacino del Mediterraneo e nelle Americhe.

Sebbene alcune razze di cani - ad esempio, i segugi ibiziani (Solano-Gallego et al., 2000) - sembrano essere più resistenti di altre, i cani sono spesso suscettibili all'infezione da *L. infantum*.

Altri fattori che predispongono alla malattia sono:

- razza: Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e Pastore Tedesco; il Segugio Ibiziano sviluppa raramente segni clinici di CanL (Franca-Silva et al, 2003);
- età: la distribuzione della malattia è bimodale, con la più alta prevalenza riportata in cani più giovani di 3 anni e più vecchi di 8 anni (Cardoso et al, 2004);
- background genetico: il *Slc11c1* (Solute carrier family 11 member a1), precedentemente chiamato N-RAMPI, e alcuni alleli dei geni MHC II sono stati associati alla suscettibilità alla CanL;
- l'ambiente, la densità dei flebotomi nelle aree endemiche, altitudine e caratteristiche geologiche del territorio (Sanchez-Robert et al, 2008);
- il clima (temperatura, tasso d'umidità);
- condizioni socio-sanitarie: malnutrizione, incidenza nella popolazione umana di immunodeficienza acquisita, elevata concentrazione di animali infetti, randagismo;
- mancanza di presidi immunizzanti (vaccini) efficaci sia nell'uomo che negli animali.

L'infezione colpisce cani di tutte le razze ed età. L'incidenza può essere legata alle abitudini di vita: i cani di grossa taglia ed in particolare i cani da caccia sono più spesso colpiti poiché vivono all'aperto, come pure i soggetti con più di nove mesi di età, per il lungo periodo d'incubazione di questa malattia (Denerolle, 1996). La minore incidenza della patologia nei cani di piccola taglia è probabilmente in relazione all'habitat estremamente domestico di questi animali, con minore possibilità di contatto con i flebotomi, soprattutto nelle ore notturne.

L'ambiente e le temperature influenzano diversi fattori come il periodo di tempo da un pasto di sangue alla maturazione delle uova, la schiusa delle uova, la lunghezza dei diversi stadi di sviluppo e il tempo di sviluppo del parassita.

L'attività notturna della specie di *P. perniciosus* è crepuscolare ed è stata descritta in aree della Spagna orientale e in Italia meridionale durante il periodo di rischio di trasmissione di *L. infantum*. La maggior parte dei flebotomi sono state catturate all'inizio della notte, dal tramonto a mezzanotte (Gaglio et al., 2014).

L'habitat di *L. infantum* è descritto come una zona cuscinetto con luoghi di riposo (umidi e freschi) per gli adulti e siti di riproduzione. In effetti, le temperature fresche sono quelle ottimali per lo sviluppo di *Leishmania*, la digestione di un pasto di sangue, e per la maturazione delle uova (Ready, 2013). Le fonti del pasto di sangue di *P. perniciosus* sono una vasta gamma di mammiferi e uccelli (Bravo-Barriga et al, 2016). Le uova sono deposte da femmine adulte in terreni caldi, umidi e ricchi di materia organica, che è richiesta dalle larve per l'alimentazione ed è anche quella in cui si impupano. Le larve sono in grado di muoversi solo per brevi distanze dal luogo di deposizione delle uova. Il raggio di dispersione degli adulti è in media di poche centinaia di metri ed è determinato dalla vicinanza dei siti di riproduzione delle larve e dalla presenza di vento moderato e mancanza di precipitazioni.

Il comportamento di ricerca del pasto di sangue da parte delle femmine adulte dipende dalla specie. I flebotomi sono classificati come:

- esofagi o
- endofagi

a seconda se pungono all'aperto o al chiuso,

e in:

- esofili e
- endofili

a seconda se riposino all'aperto o al chiuso dopo un pasto di sangue, rispettivamente.

I principali vettori di *Leishmania* nei Paesi europei meridionali, le femmine di *P. perniciosus*, sono prevalentemente esofagiche ed esofile (riposano all'aperto mentre le loro uova maturano). In zone endemiche, la migliore strategia di controllo sarà l'uso di repellenti per insetti in tutta la popolazione canina e una combinazione fattibile di vaccinazione in cani sani sieronegativi. Anche se entrambe queste misure sono considerate ugualmente necessarie nei cani sani, la vaccinazione non evita l'infezione mentre i repellenti potrebbero effettivamente ridurre il rischio di trasmissione (Killick-Kendrick, 1999) (vedi capitolo Spot-on).

# DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

Nell'ultimo decennio, il numero di casi di leishmaniosi importati è aumentato nei Paesi dell'Europa occidentale. Questa tendenza è associata all'aumento dei viaggi, dell'attività ecoturistica, delle operazioni militari e dell'immigrazione (Di Muccio et al., 2015).

In Europa, i flebotomi si trovano prevalentemente nell'area del Mediterraneo, ma sono stati recentemente catturati anche a nord delle Alpi, in Carinzia (Naucke et al., 2011), in Austria e in Baviera (Haeberlein et al., 2013), e in Ungheria (Farkas et al., 2011).

Dagli anni '90, nuovi focolai di LCan sono stati rilevati nell'Italia settentrionale, precedentemente considerata non endemica. La malattia è aumentata gradualmente nella regione alpina e le indagini scientifiche hanno dimostrato la presenza accertata di due vettori della malattia, *Phlebotomus perniciosus* e *P. neglectus* in diverse località della zona (Signorini et al., 2014).

La malattia ha subito profondi cambiamenti a causa del movimento e dell'introduzione di cani infetti dalle aree endemiche, mentre lo spostamento latitudinale nella distribuzione dei vettori potrebbe essere legato ai recenti cambiamenti climatici e ad altri cambiamenti ambientali (ad es. urbanizzazione e deforestazione) che hanno avuto un grande impatto sulle condizioni di vita (Ferroglio et al., 2005). Sono necessarie, pertanto un'accurata anamnesi del paziente e l'identificazione del parassita per distinguere tra i casi autoctoni e quelli importati. Questo è particolarmente importante, poiché nuove specie di *Leishmania* possono essere introdotte e trasmesse da vettori flebotomi locali senza sorveglianza appropriata, con conseguenze imprevedibili.

Il Centro di Riferimento per l'Identificazione della *Leishmania* di Palermo ha eseguito degli studi dal 1986 al 2012, proprio allo scopo di analizzare i casi sospetti, di individuare i metodi utili per l'identificazione del flebotomo e di mostrare le specie presenti nel Paese. Questo ha coinvolto i centri sanitari di 16 regioni italiane (Di Muccio et al., 2015). In questo studio, sono state identificate ben otto specie di *Leishmania*, di cui sette esotiche per l'Italia.

L'importazione di VL fino al 1995 era associata alla diffusione delle coinfezioni mediterranee Leishmania-HIV. In seguito all'introduzione del trattamento HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy), tali casi sono diventati occasionali negli italiani ma relativamente frequenti tra gli immigrati. Al contrario, un aumento costante di casi di CL è stato osservato in diverse aree europee, anche se molti casi sicuramente non sono stati identificati. L'entità più diffusa della leishmaniosi endemica in Europa meridionale è la VL zoonotica, spesso associata alla CL sporadica. Entrambe le malattie sono causate da *L. infantum* e i cani domestici sono i principali ospiti reservoir. L'incidenza della malattia clinica è relativamente bassa, con una media di circa 700 casi riportati ogni anno, mentre si pensa che le infezioni asintomatiche siano diffuse. Nell'ultimo decennio, la leishmaniosi (specialmente la CL) è diventata una minaccia per i viaggiatori internazionali (Gradoni, 2013).

Nei Paesi europei non endemici, l'aumento della leishmaniosi importata è stato documentato da grandi serie di casi riportati da Austria, Francia, Germania, Paesi Bassi e Regno Unito. La VL è stata acquisita soprattutto nell'Europa meridionale, mentre la CL, che colpisce la maggior parte dei casi, è stata acquisita nell'Africa subsahariana e settentrionale, Medio Oriente, Asia

centrale e nelle Americhe. Si deve considerare che, in aree non endemiche, i casi importati possono rimanere non riconosciuti a causa della mancanza di familiarità dei medici con la malattia; d'altra parte, ogni caso diagnosticato di leishmaniosi viene registrato come importato (Di Muccio et al., 2015).

In Italia risulta diffusa *Leishmania infantum* responsabile dei casi umani così come dei casi canini; per quanto riguarda i flebotomi delle specie presenti in Italia, soltanto tre risultano responsabili della trasmissione della malattia: *Phlebotomus perniciosus*, *P. perfiliewi* e *P. major*.

La malattia è tipica delle regioni temperate e di quelle tropicali: in Italia è presente nelle varie forme sui versanti tirrenico, adriatico e ionico e più precisamente nelle zone rurali e periurbane della costa tirrenica, nelle zone collinari ad ovest dell'Appennino, sulla costa dello Ionio e del basso Adriatico fino al Gargano, e in tutte le isole (Verso et al., 2003). La distribuzione geografica del flebotomo è nota per essere fortemente legata alle condizioni ambientali che possono influenzare la sua presenza e densità, come l'altitudine, la vegetazione e i fattori climatici (per esempio temperature e umidità del suolo) (Signorini et al., 2014). L'esistenza di fattori climatici favorevoli, accompagnata dalla presenza nel territorio di soggetti immunodepressi, quali ad esempio i malati di AIDS o i trapiantati d'organo maggiormente suscettibili di contrarre infezioni, contribuisce al diffondersi della malattia. (Verso et al., 2003).

## In passato

La leishmaniosi ha sempre destato l'interesse della medicina del lavoro, sia in passato, quando l'economia del nostro Paese era fondata quasi esclusivamente sull'agricoltura, ma anche in tempi recenti, in quanto i soggetti professionalmente esposti ed appartenenti a varie categorie sono ancora molto numerosi contrariamente a quanto si possa pensare. Infatti, poiché i flebotomi trovano un habitat ideale nelle zone di accumulo della spazzatura, gli operatori ecologici, nelle zone endemiche, sono particolarmente interessati per ragioni lavorative, così come coloro che espletano la loro attività in zone paludose e nelle campagne umide (Verso et al., 2003).

Prima del 1990, non c'erano prove convincenti della trasmissione locale di *L. infantum* a nord della Liguria e dell'Emilia-Romagna; dall'inizio del 1990 alla metà degli anni 2000, l'analisi retrospettiva della letteratura e le indagini prospettiche sul campo su LCan hanno permesso di identificare circa 20 focolai di malattia nei territori prealpini e padani delle 5 regioni settentrionali dell'Italia continentale (Valle d'Aosta, Piemonte, Lombardia, Veneto e Friuli-Venezia Giulia), con circa 150 cani autoctoni infetti (Maroli et al., 2008).

Mentre è difficile stabilire esattamente quando una trasmissione locale di *L. infantum* ha avuto luogo per la prima volta nell'Italia settentrionale continentale, una colonizzazione trentennale verso nord da parte dei vettori flebotomi *P. perniciosus* e *P. neglectus* è ben supportata da prove scientifiche. Questi autori riportano una fondamentale indagine entomologica condotta negli anni 1965-1974 che ha indagato un totale di 164 siti di tutte le regioni prealpine a nord della Liguria e dell'Emilia-Romagna, e ha trovato 7 siti positivi per *P.*

*perniciosus*, 4 siti positivi per *Phlebotomus ariasi* e nessuno per *P. neglectus*. Nessun flebotomo è stato trovato in Valle d'Aosta e in Lombardia. Questo potrebbe essere considerato come la linea di base per le condizioni sfavorevoli di trasmissione locale in quel periodo (Gradoni et al., 2022).

Per quanto riguarda il numero delle denunce per malattia relative alle regioni italiane nel 1999, come diffuso dal Bollettino epidemiologico del Ministero della Sanità, la CL ha annoverato 17 casi, e precisamente 2 in Piemonte, 2 in Lombardia, 1 in Veneto, 1 in Liguria, 3 in Toscana, 2 in Campania, 1 in Calabria, 4 in Sicilia e 1 in Sardegna. Per quanto concerne la forma viscerale, invece, il numero di denunce è stato sensibilmente maggiore: 141. Il rapporto uomini-donne è stato mediamente nelle varie regioni di circa 2:1. La Sicilia, come si può notare (Tabella 2), è sempre molto ben rappresentata.

Regione	Numero di casi denunciati
Valle d'Aosta	0
Piemonte	1
Lombardia	2
Trentino-Alto Adige	1
Veneto	0
Friuli-Venezia Giulia	0
Liguria	5
Emilia-Romagna	2
Toscana	2
Marche	1
Umbria	1
Lazio	19
Abruzzo	2
Campania	49
Molise	1
Puglia	12
Basilicata	0
Calabria	6
Sicilia	32
Sardegna	5
Totale in Italia	141

Tabella 2. Numero dei casi di leishmaniosi viscerale denunciati nel 1999 in Italia (Verso et al., 2003)

Si cerca di lottare per contrastare l'infezione, ma il cammino è ancora lungo, soprattutto per la presenza nel nostro territorio di un ingente numero di cani infetti che costituiscono pericolosi serbatoi. Indubbiamente, vi è scarso interesse sulla tematica da parte dei medici

non specialisti in infettivologia; inoltre, ad un'indagine del fenomeno si ha la sensazione che vi sia una sottostima della reale entità delle malattie infettive sul territorio, in quanto probabilmente non tutti i casi vengono denunciati o, addirittura, diagnosticati.

Accade poi che le metodiche utilizzate ai fini dell'accertamento della diagnosi non diano sempre risultati veritieri, in quanto non tutte risultano essere altamente sensibili e pertanto anche in presenza di un contesto clinico indicativo può venire a mancare il supporto laboratoristico; il coinvolgimento congiunto della classe medica e di quella veterinaria rappresenta dunque una tappa

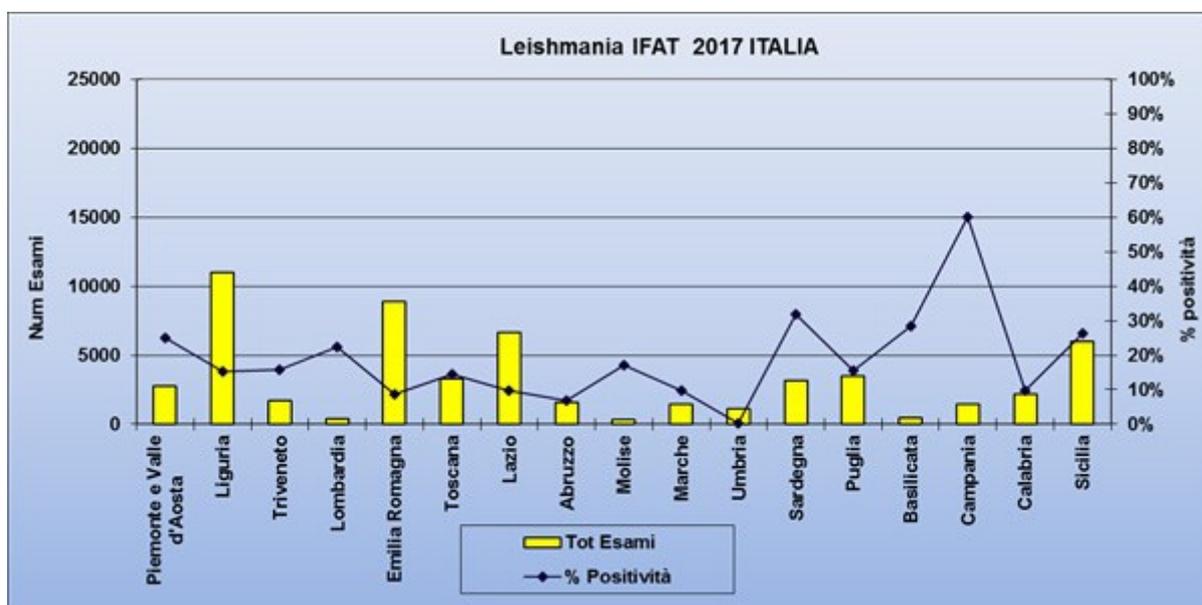
obbligata, ed è il presupposto fondamentale perché si arrivi alla vera soluzione del problema, in quanto non è possibile pensare a risultati indipendenti. La malattia va debellata nel suo complesso, e quindi il successo in campo umano non può prescindere dal coinvolgimento di coloro che se ne occupano in campo veterinario; ogni occasione di incontro e di confronto rappresenta per questa antropozoonosi come per tutte le altre, un momento di crescita necessario al raggiungimento dei traguardi che si prefigge la medicina preventiva relativamente alle malattie che causano gravi danni alla salute pubblica (Verso et al., 2003).

## Situazione attuale

*Phlebotomus perniciosus* è la principale specie vettore della leishmaniosi canina nell'Italia nord-orientale. Signorini et al. (2014) hanno condotto uno studio che comprendeva tre province del nord-est Italia: Veneto, Friuli-Venezia Giulia e Trentino-Alto Adige. È stato notato che queste aree presentano caratteristiche orografiche e climatiche varie a causa della coesistenza di diversi microclimi influenzati dalla presenza delle Alpi e delle Prealpi, del Lago di Garda, della pianura Padana e la costa del mare Adriatico. Il clima è continentale con estati calde che superano i 30 °C, in particolare nelle pianure si hanno inverni generalmente freddi con temperature inferiori a 0 °C ad alta quota. Nelle aree pianeggianti della Pianura Padana, le temperature possono scendere a valori sotto i -10 °C e rimanere sotto lo 0 °C anche durante il giorno. Al contrario, il clima è quasi mediterraneo nelle aree adiacenti al Lago di Garda. Le precipitazioni variano a seconda dell'altitudine e dei venti prevalenti.

La previsione di MaxEnt (maximum entropy theory) evidenzia una distribuzione diseguale delle aree idonee per *P. perniciosus*, raggruppate in alcune località, caratterizzate da specifiche peculiarità ambientali (aree collinari, con clima temperato, elevata copertura vegetale e precipitazioni moderate) coerenti con i requisiti biologici ed ecologici della specie. La più alta probabilità relativa di presenza è stata prevista in aree collinari, tra 100 e 300 m sopra il livello del mare. Le aree con temperature invernali notturne inferiori a -4 °C, sono state descritte come inadatte alla presenza del flebotomo. La più alta probabilità relativa di presenza è stata invece prevista in aree dove la temperatura estiva diurna era compresa tra 25 °C e 33 °C, mentre la temperatura limite inferiore era di 16,5 °C. Le mappe prodotte da questo studio possono aiutare le autorità sanitarie locali e nazionali a progettare future strategie di controllo e sorveglianza volte a ridurre la prevalenza della LCan solo in aree a più alto rischio (Signorini et al., 2014).

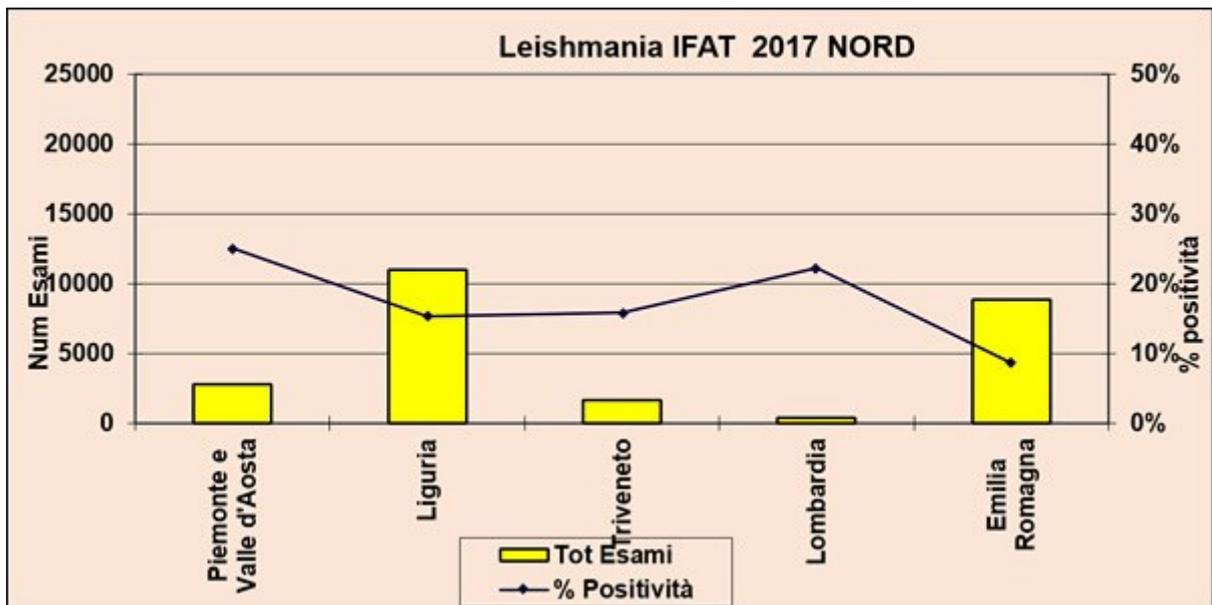
In tutta Italia la percentuale media di siero prevalenza nel 2017 è stata del 18,65% con un numero totale di 55.774 esami svolti di cui 10402 esami positivi. I dati ottenuti, inoltre, mostrano, come le Regioni Piemonte, Toscana, Veneto, e Sardegna, abbiano una interessante circolazione del parassita *Leishmania*, con percentuali di siero- prevalenza maggiori rispetto agli anni passati, sintomo non solo di una maggiore diffusione del parassita, ma anche di una minore sorveglianza della patologia.



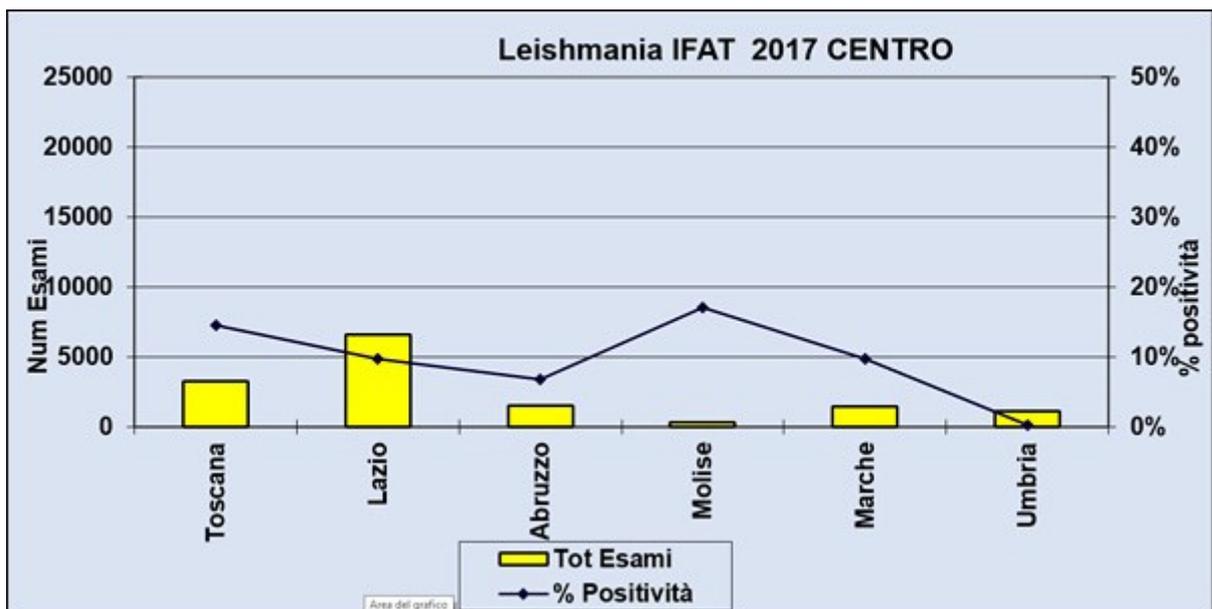
Da diversi anni il centro di riferimento Nazionale per le Leishmaniosi (C.Re.Na.L.) lavora, in sinergia con tutti gli IZZSS di Italia, in ambito epidemiologico, al fine di raggiungere gli obiettivi di seguito riportati:

- creazione di banca dati;
- sviluppo e gestione di sistemi informativi;
- studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo.

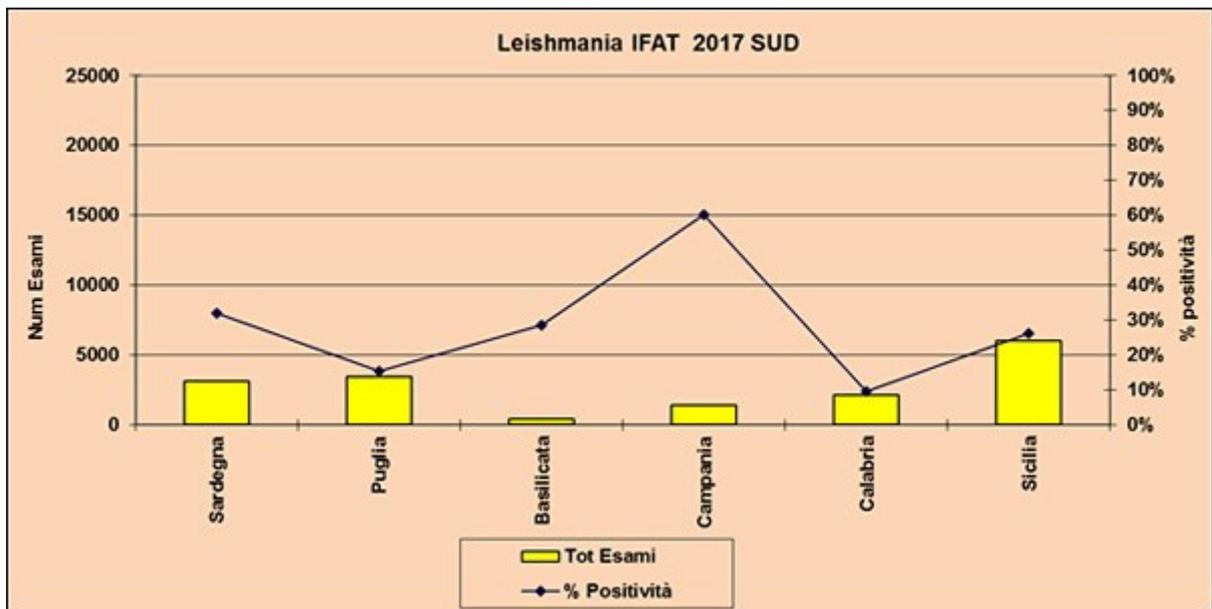
Da un punto di vista attuativo si è resa necessaria la determinazione dei diversi cut-off sierologici nelle diverse regioni, necessari per poter definire la prevalenza sierologica. La differenza di cut-off fra le diverse regioni comporta una differente valutazione epidemiologica e di conseguenza un differente calcolo di prevalenza della positività IFAT dipendentemente dalla zona geografica.



Nella macroregione del Nord Italia la percentuale media di siero prevalenza nel 2017 è del 14,21% con un numero totale di 24716 esami svolti di cui 3513 esami positivi, ovvero con un valore cut-off di 1:40.



Nella macroregione del Nord Italia la percentuale media di siero prevalenza nel 2017 è del 7,42% con un numero totale di 14181 esami svolti, di cui 1053 esami positivi.



Nella macroregione del Sud Italia la percentuale media di siero prevalenza nel 2017 è del 32,76 % con un numero totale di 16627 esami svolti di cui 5448 esami positivi, ovvero con un valore cut-off di 1:160.

(<https://www.salute.gov.it/portale/sanitaAnimale/dettaglioContenutiSanitaAnimale.jsp?lingua=italiano&id=220&tab=2>)

Gradoni et al. (2022) hanno monitorato l'ulteriore diffusione di focolai endemici di *Leishmania* nel corso del 2018-2019, in cinque regioni (Valle d'Aosta, Piemonte, Lombardia, Veneto e Friuli-Venezia Giulia). Cinquantasette comuni il cui stato enzootico della CanL non era stato segnalato prima del 2018, sono stati identificati come endemici. È stata anche confermata la stabilità di 27 focolai registrati negli ultimi dieci anni. I vettori flebotomi competenti, principalmente *Phlebotomus perniciosus*, sono stati raccolti per la prima volta in 23 comuni. I nuovi comuni endemici registrati sembrano essere distribuiti su un gradiente decrescente da ovest a est: 30 in Piemonte, 21 in Lombardia, 4 in Veneto e 2 in Friuli-Venezia Giulia. Per quanto riguarda il Veneto, va notato che è stato indagato un territorio relativamente ristretto in quanto diversi comuni della regione erano già stati censiti e rilevati come endemici per la LCan in passato. Le condizioni climatiche fredde della regione più orientale del Friuli-Venezia Giulia, confinante con territori non endemici della Slovenia, sono probabilmente meno favorevoli alla trasmissione di *L. infantum*.

Nell'Italia settentrionale continentale, l'insorgenza di LCan e leishmaniosi umana autoctone è stata associata a un'espansione trentennale verso nord e all'aumento della densità dei vettori flebotomi *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus neglectus* (Maroli et al., 2008).

Mentre una ventina di comuni indagati già noti come endemici per la leishmaniosi si sono confermati tali, i nuovi territori endemici registrati da questo studio non sono stati distribuiti uniformemente nelle 5 regioni indagate, in quanto i risultati hanno mostrato un evidente gradiente decrescente da ovest a est: 30 comuni neoendemici rilevati in Piemonte, 21 in Lombardia, 4 in Veneto e 2 in Friuli-Venezia Giulia. Per quanto riguarda il Veneto, tuttavia, questo potrebbe essere parzialmente spiegato dai record relativamente vecchi di endemicità

della CanL che coinvolgono diversi comuni delle province di Verona e Padova, che erano stati attivamente indagati in passato, per cui i nuovi territori di indagine erano in numero limitato (Gradoni et al., 2022).

Tra i nuovi record endemici, i comuni in ambienti collinari prealpini e preappenninici sono stati i più rappresentati, mentre le terre basse della pianura padana caratterizzate da agricoltura intensiva o ambienti umidi sono state coinvolte solo sporadicamente. In Lombardia sono chiaramente visibili due fasce territoriali di endemicità di LCan, una costituita da siti prealpini a nord, la seconda da siti preappenninici a sud-ovest. Va notato che la presenza del flebotomo, in particolare di *P. perniciosus*, è stata recentemente segnalata dalle pianure nord-orientali del Veneto e del Friuli-Venezia Giulia.

Il Sud Italia comprende regioni ad elevata endemia, dal momento che l'infezione risulta ampiamente diffusa in tutto il territorio. A differenza di altre aree geografiche, bisogna però affermare che la malattia nell'uomo, con le sue varie forme, ha una prevalenza minore, soprattutto se ci si riferisce a Paesi del Mediterraneo a basso livello di sviluppo e con carenze igienico-sanitarie, che dunque rivestono un ruolo determinante nel mantenimento dell'agente eziologico nell'uomo come negli animali, nonché dei vettori nell'ambiente.

In Sicilia, per esempio, l'elevata diffusione dell'infezione nella popolazione canina risulta essere una realtà molto seria ed urgente da affrontare e risolvere per quanto riguarda la salute pubblica.

(Verso et al., 2003)

Per quanto riguarda la prevalenza della LCan, l'Italia è risultata al primo posto per sieroprevalenza mediana (17,7%) tra i paesi dell'Europa sud-occidentale nel periodo 1971-2006, come determinato da sierosondaggi che hanno coinvolto più di 420.000 cani (Franco et al., 2011). A causa delle caratteristiche geomorfologiche del paese, tuttavia, la CanL non presenta una diffusione omogenea nel territorio italiano, essendo tipicamente più prevalente nelle popolazioni canine della costa tirrenica, nei territori interni della penisola meridionale e nelle isole. All'inizio dell'espansione verso nord della malattia, i tassi di cani autoctoni sieropositivi provenienti dai territori prealpini e della valle del Po sono risultati in media dell'1,8%-2,6% (Maroli et al., 2008), in contrasto con tassi spesso superiori al 30% nei territori meridionali e nelle isole (Franco et al., 2011).

Due valori di prevalenza puntuale sono stati registrati in comuni della provincia di Vicenza, e sono risultati diversi tra loro di circa dieci volte (2,4% a Valdagno contro 22,4% a Caltrano). Questo dato conferma la presenza sparsa nel nord Italia di focolai di nuova costituzione con intensa trasmissione, dove la sieroprevalenza canina può raggiungere valori simili a quelli riscontrati nel sud Italia. D'altra parte, i dati raccolti e aggiunti da una serie di altri siti della provincia di Vicenza, e che hanno coinvolto più di 500 cani in totale, hanno portato al 6,6% di prevalenza di CanL autoctona, che sembra essere una cifra più ragionevole per descrivere la situazione complessiva. Per un confronto con i dati precedenti della stessa regione Veneto, nel 2003-2005 la prevalenza di sieropositivi per *L. infantum* autoctoni provenienti da due

focolai e che hanno coinvolto circa 1100 cani esaminati, è stata rispettivamente dell'1,7% in provincia di Verona e dell'1,0% in provincia di Treviso.

È degno di nota il fatto che due importanti centri diagnostici privati italiani per la CanL hanno recentemente riportato valori di sieropositività a *L. infantum* pari al 21,6% su 21.545 cani esaminati provenienti da regioni del nord Italia, in un periodo di 10 anni (Gradoni et al., 2022).

Un'altra curiosità fornitaci da Morosetti et al. (2020) indica che i cani di razza pura hanno mostrato una sieroprevalenza significativamente più alta rispetto alle razze miste (con una maggior percentuale di casi in Pastore tedesco, Golden Retriever e Labrador).

Diversi fattori, tra cui il cambiamento climatico e il riscaldamento globale, possono promuovere la biologia e la diffusione dei vettori, mentre la globalizzazione, l'aumento degli spostamenti degli animali da compagnia con i loro proprietari, il trasferimento e la rapida crescita della popolazione umana e canina hanno causato un'espansione geografica delle leishmaniosi sia nelle regioni endemiche che in quelle precedentemente non colpite (Colombo et al., 2021).

Lo studio condotto da Mendoza-Roldan et al. (2020) che ha coinvolto più di 20 mila cani ha riportato che esiste una differenza significativa nella prevalenza di *L. infantum* tra le diverse macroaree di studio: si è verificata una positività complessiva del 28,2% nell'Italia meridionale e nelle isole, del 29,68% nell'Italia centrale e del 21,62% nell'Italia settentrionale.

Nel complesso, l'esposizione al flebotomo si è diffusa progressivamente negli ultimi decenni dalle regioni meridionali endemiche verso le regioni settentrionali, rendendo l'intera penisola italiana endemica per questa infezione (Figura 5). La diffusione verso nord dei principali vettori del flebotomo supporta l'evidenza di endemicità di *L. infantum* e la comparsa di nuovi focolai. Inoltre, la percezione e la consapevolezza dei medici della presenza di LCan in aree non endemiche sembrano essere aumentate nelle regioni settentrionali, mentre il Sud rimane l'area con il maggior numero di test richiesti (Mendoza-Roldan et al., 2020).



Figura 5. Evoluzione in Italia della leishmaniosi canina negli ultimi 40 anni  
(<https://mypetandme.elanco.com/parassiti/leishmaniosi/diffusione-in-italia/>)

# DIAGNOSI LEISHMANIOSI

La diagnosi di CanL è complessa perché lo spettro clinico è ampio, caratterizzato da segni clinici banali, per questo, spesso trascurati dal proprietario e la gamma di anomalie clinicopatologiche basate su almeno un emocromo completo, profilo biochimico e analisi delle urine potrebbe non essere sufficiente e specifico, in quanto i cani con leishmaniosi potrebbero essere co-infettati da altre malattie trasmesse da vettori o soffrire di altre malattie infettive o non infettive concomitanti, rendendo la diagnosi più complicata (Solano-Gallego, 2011).

Per migliorare la prognosi ed evitare sia la trasmissione umana e animale (da casi falsi negativi) e l'inutile eutanasia (da casi falsi positivi), la diagnosi dovrebbe essere stabilita il più presto possibile, anche sulla base di solo alcuni o anche un solo segno clinico (Figura 6).



Figura 6. Manifestazioni cliniche e caratteristiche immunologiche dell'infezione da *L. infantum* nei cani (Solano-Gallego, 2011).

Il primo passo è quello di effettuare un esame clinico dettagliato per cercare dei segni che possano essere attribuiti (o meno) alla leishmaniosi (Gharbi et al., 2015).

Un test di diagnosi efficace, oltre a essere in grado di confermare un sospetto clinico in un singolo paziente così come di rilevare l'infezione in cani asintomatici, dovrebbe avere un'alta sensibilità, specificità e riproducibilità; deve essere semplice, facile da eseguire, non costoso, realizzabile in laboratori regionali o adattabile alle condizioni del campo. Idealmente, dovrebbe rilevare tutti i cani infetti da *Leishmania*, utilizzando preferibilmente la raccolta non invasiva di campioni biologici (Maia et Campino, 2008).

Tuttavia, la diagnosi precisa di CanL può anche rivelarsi complessa, poiché non tutti gli animali infettati con promastigoti attraverso il morso di un vettore sviluppano manifestazioni cliniche (Alvar et al., 2004).

Quindi, l'individuazione precoce di animali infetti, in particolare prima della comparsa dei sintomi e, in alcuni casi, anche prima della sierconversione, può essere critico nel controllo della diffusione della malattia ed è diventato una parte essenziale del controllo della leishmaniosi umana.

## Segni clinici

Lo spettro patologico della leishmaniosi canina è molto vario a causa delle differenze nel parassita e delle diverse risposte dei singoli cani, dando luogo a diverse forme cliniche. Queste forme variano da una condizione anergica con diffusione generalizzata, un alto numero di parassiti e pochi o nessun segno clinico (Figura 7), a forme iperreattive, in cui non vengono

rilevati parassiti ma i cani presentano significative lesioni organiche e grave sintomatologia (Alvar et al., 2004).

Nella leishmaniosi viscerale canina, la distribuzione del parassita è estesa in tutto l'organismo: milza, fegato, ghiandole linfatiche, midollo osseo, rene, pelle, ecc., al contrario di quanto avviene nell'uomo, dove il parassita è normalmente limitato a midollo osseo, milza e fegato. Dopo la puntura, i parassiti sono rapidamente distribuiti al linfonodo e alla milza attraverso il sangue o la linfa, e da lì vanno ai reni e al fegato. Più tardi, si diffondono agli organi riproduttivi, alla pelle, alla vescica, all'apparato digerente e respiratorio, ecc. La presenza di parassiti in diversi tessuti e organi provoca reazioni che producono lesioni e sintomi caratteristici della leishmaniosi canina, reazioni infiammatorie proliferative che provocano un'infiltrazione cellulare che si estende a zone sempre più estese, causando una progressiva alterazione e squilibrio funzionale degli organi colpiti (Alvar et al., 2004).

I segni clinici della CanL si manifestano dopo un periodo di incubazione da due a otto mesi, e fino a quindici mesi.



Figura 7. Cane asintomatico (apparentemente sano ma infetto da *L. infantum*) (Raul Rio Ribeiro et Cristiano Cheim Peixoto dos Santos, 2018)

I principali gruppi di segni clinici della CanL sono descritti di seguito.

La malattia renale può essere considerata la principale manifestazione clinica della CanL. Glomerulonefrite e nefrite tubulointerstiziale dovuta alla deposizione dell'immunocomplesso sono i risultati patologici più comuni nei cani leishmaniotici che sviluppano un'insufficienza renale cronica, che è la principale causa di morte nella CanL.

Nonostante l'alta prevalenza di patologia renale nei cani infetti, l'azotemia renale è un risultato di laboratorio relativamente poco comune (Solano-Gallego et al., 2011). Da tenere ben presente è il fatto che i cani con un'infezione definita, ma con poca o nessuna risposta umorale, non sviluppano lesioni renali (Alvar et al., 2004).

Le lesioni cutanee sono le seconde manifestazioni cliniche più comuni e una vasta gamma di entità dermatologiche è stata classificata in gruppi (le percentuali riportate provengono da uno studio di Ferrer su 43 cani):

- alopecia e peeling (dermatite esfoliativa senza prurito) generalizzata o localizzata su viso, orecchie e arti (60%);

- dermatite ulcerosa con ulcere nella pelle di arti e delle articolazioni (23%);
- dermatite nodulare focale o multifocale (11%) (Figura 8);
- dermatite pustolosa ed esantema generale (6%).
- dermatite papulosa.



Figura 8. Forma nodulare (mento di un Siberian Husky), depigmentazione della pelle (Blavier et al., 2001).

Altre manifestazioni cutanee meno frequenti sono:

- depigmentazione,
- ipercheratosi sul naso, sulla testa o sul cuscinetto plantare (Figura 9),
- onicogrifosi,
- perionissi
- onicorressi (Iannetti et al., 2001)
- alopecia diffusa non pruriginosa: può essere associata a secchezza seborrea con squame bianco-argento, che può essere localizzata (principalmente sulla regione dorso-lombare) o diffusa in tutto il corpo. Il cane presenta cheratosi follicolare e, in alcuni casi, paracheratosi con un infiltrato infiammatorio, talvolta associato a istiociti, plasmociti e macrofagi. Gli amastigoti di *Leishmania* sono talvolta presenti.
- ulcere cutanee o mucose multifocali possono essere associate a necrosi degli strati epidermici e dermici
- noduli generalizzati o localizzati allo spazio interdigitale; noduli ulcerati, dermatite nodulare con un infiltrato infiammatorio, contenente macrofagi con alto contenuto di parassiti e alcuni linfociti e plasmociti. (la forma nodulare è più frequentemente vista nelle razze boxer)
- lesioni cutanee atipiche e rare: con depigmentazione e pannicolite associate all'ipercheratosi nasale. Queste lesioni possono anche essere trovate sul cuscinetto plantare (Gharbi et al., 2015).



Figura 9. Tumefazione, ipercheratosi e pustole del cuscinetto plantare (Sgorbini et al., 2009)

I segni dermatologici variano nel tipo e nell'intensità, ma non sono associati a prurito (Gharbi et al., 2015).

La linfadenopatia (aumento delle dimensioni e della consistenza dei linfonodi) è un segno clinico molto comune, che di solito appare relativamente presto durante il corso della malattia. L'aumento generale delle dimensioni dei linfonodi facilita la palpazione di quelli superficiali, in particolare, poplitei, prescapolari e sottomascellari. Sono state descritte anche notevoli splenomegalie.

Le manifestazioni oculari sono abbastanza frequenti durante la CanL. Tra quelle più frequenti ricordiamo:

- la congiuntivite, da mucosa a mucopurulenta (caratterizzata da una secrezione che aderisce ai margini lacrimali mentre la mucosa è solitamente pallida, a causa dell'anemia)
- la blefarite (esfoliativa, ulcerativa o nodulare),
- l'uveite anteriore o posteriore
- la cheratocongiuntivite (Figura 10).



Figura 10. Cheratocongiuntivite secca (<https://www.alessandroprota.it/la-cheratocongiuntivite-secca-kcs-nel-cane-e-nel-gatto/>)

Essendo una malattia sistemica che potrebbe coinvolgere molti organi, può presentare una varietà di altri segni clinici, rendendo spesso difficile la diagnosi differenziale con altre malattie: perdita di peso, anomalie locomotorie, apatia e anoressia sono ancora abbastanza frequenti; meno frequenti sono polidipsia, polifagia, poliuria, epistassi, vomito e diarrea. In particolare, cachessia e atrofia muscolare sono risultati comuni nei cani nelle fasi finali della malattia, quando le anomalie locomotorie sono anche frequenti. Queste potrebbero essere associate all'artrite, all'osteomielite e all'artrosinovite nelle forme cliniche di leishmaniosi. Altre manifestazioni non comuni includono la malattia neurologica e la polimiosite, così come vari disturbi autoimmuni e cardiovascolari (pericardite, vasculite) (Iannetti et al., 2001).

La meningite causata da *L. infantum* è stata descritta con anticorpi contro il parassita che compaiono nel liquido cerebrospinale. Questo danno generale ai tessuti e agli organi dei cani infetti è caratteristico ed è paragonabile alla situazione nelle persone coinfectate con il virus dell'immunodeficienza umana e la *Leishmania*, descritta in anni recenti. L'assenza di difese in

questi pazienti umani permette al parassita di diffondersi in luoghi insoliti, il che suggerisce che, nel caso dei cani, tale situazione è il risultato di una grave depressione immunitaria indotta dal parassita, cioè un'immunodepressione che all'inizio è specifica per il parassita ma che alla fine colpisce tutte le funzioni delle cellule T dell'animale colpito (Alvar et al., 2004).

Di seguito verranno analizzati la maggior parte dei sintomi.

### **Sintomi precoci**

Solo le infezioni sperimentali ci hanno fornito la conoscenza di ciò che si verifica inizialmente. In generale, non esiste una sintomatologia chiara e precisa in questa fase iniziale: può variare da alterazioni aspecifiche nelle condizioni generali dell'animale, con un debole inizio insidioso, a uno sviluppo progressivo e crescente. Frequentemente si verifica una perdita lenta ma costante di peso, accompagnata da astenia e apatia. Dal terzo mese è possibile osservare sintomi cutanei (macchie prive di pelo periorbitali e auricolari), lieve interessamento cardiaco, congiuntivite e dolore alla palpazione renale. I sintomi cutanei, col passare del tempo, possono estendersi notevolmente (Figura 11).



*Figura 11. Alopecia generalizzata non pruriginosa (Raul Rio Ribeiro et Cristiano Cheim Peixoto dos Santos, 2018)*

### **Periodo patologico**

La maggior parte dei cani infetti presenta i sintomi caratteristici della malattia, ma in altri non appaiono nemmeno.

Una serie di sintomi comuni non specifici può essere l'ipertermia tra 39° e 40°, l'apatia, l'astenia, l'alterazione dell'appetito, la polidipsia, la perdita di peso, ecc. Tra i sintomi più caratteristici di questa fase spicca la linfadenopatia con un aumento delle dimensioni e della consistenza dei linfonodi. Anche l'epatomegalia e la splenomegalia sono notevoli in questa fase della malattia. Molto comune è anche la presenza di lesioni cutanee, da piccole macchie prive di pelo coperte da abbondante desquamazione a ulcere crostose più o meno estese. Queste lesioni normalmente iniziano intorno al naso, alle orbite oculari e alle orecchie (Figura 12), diffondendosi successivamente su tutto il corpo.

Il prurito è notevolmente assente.



Figura 12. Faccia esterna del padiglione auricolare: sono visibili due placche ulcerate e ricoperte da croste (Sgorbini et al., 2009)

La sintomatologia cutanea è diversa nei cani e negli esseri umani; in questi ultimi, c'è un'inflammazione locale e i cambiamenti patologici sono limitati a questa sede, mentre nei cani la pelle è colpita durante la progressione della malattia verso gli organi interni.

Ferrer (1989), in uno studio su 43 cani con lesioni cutanee, ha classificato i sintomi cutanei in quattro gruppi:

- il 60% dei cani studiati aveva alopecia e desquamazione, con numerosi amastigoti nei macrofagi della pelle;
- il 23% dei cani avevano dermatosi ulcerativa, caratterizzata dalla presenza di ulcere (Figura 13) nella pelle degli arti e in corrispondenza delle articolazioni, con pochi amastigoti;
- la dermatite nodulare è stata notata nell'11% dei casi, caratterizzata dalla comparsa di noduli cutanei con un gran numero di macrofagi parassitati;
- la dermatite pustolosa ha colpito il 6% dei cani esaminati, ed era caratterizzata dalla comparsa di un esantema su tutto il corpo, ma i parassiti non potevano essere rilevati istologicamente.



Figura 13. Lesioni ulcerative alle prominenze ossee degli arti posteriori (Raul Rio Ribeiro et Cristiano Cheim Peixoto dos Santos, 2018)

Anche i sintomi oculari sono abbastanza frequenti, con una congiuntivite da mucosa a mucopurulenta, con una secrezione giallastra che aderisce al margine lacrimale. La mucosa è pallida a causa dell'anemia. Può verificarsi una cheratite, che progredisce con l'ulcerazione e la successiva cecità. Lo scolo nasale è comune (Figura 14), progredendo da sieroso a

mucopurulento. L'epistassi può essere unica o bilaterale, variando da un gocciolamento intermittente ad una importante emorragia.



Figura 14. Vasta ulcerazione a margini netti e dall'aspetto bizzarro a carico della narice destra associata ad ipercheratosi (Sgorbini et al., 2009)

L'atrofia muscolare è frequente e aumenta con il progredire della malattia. Nel corso della leishmaniosi canina, possono comparire la perionissiti, l'onicogrifosi e l'onicorressi; anche il sistema nervoso può essere interessato, con manifestazioni di tremore, carenze motorie e, negli ultimi stadi, anche di paralisi degli arti posteriori. In alcuni casi, sono presenti artrite, zoppia, osteomielite e artrosinovite.

### **Periodo finale**

Il tempo di comparsa dei sintomi è molto vario (da due o tre mesi ad anni dopo l'infezione); allo stesso modo, l'arrivo dell'ultima fase della malattia è difficile da prevedere. In questa fase, la maggior parte degli organi del cane sono colpiti e le ulcere e le zone della cute prive di pelo sono diffuse. I cani in questo momento mostrano cachessia, e la morte è il risultato di un'insufficienza renale o epatica. In questa fase, possono verificarsi infezioni opportunistiche (Alvar et al., 2004; Solano-Gallego, 2011).

## **Metodi diagnostici**

La diagnosi della leishmaniosi canina non differisce sostanzialmente da quella dell'uomo; in entrambi i casi, i dati clinici, epidemiologici, parassitologici e biochimici ottenuti devono essere considerati insieme (Alvar et al., 2004).

I metodi di diagnosi si dividono in isolamento del parassita (diretto e indiretto) e tecniche immunodiagnostiche per rilevare le risposte cellulari e risposte umorali (Tabella 3).

Inizialmente, è bene escludere (o confermare) la presenza di *Leishmania* attraverso dei semplici esami di laboratorio. Eventualmente, sulla base dei riscontri clinici, possono poi essere svolti degli esami di approfondimento (Tabella 4).

BOX 2 Rilievi compatibili con LCan negli esami di laboratorio di base e di approfondimento		
Esami di base	Riscontri compatibili con leishmaniosi	Esami di approfondimento
<b>Emocromocitometrico</b>	Anemia scarsamente o non rigenerativa Possibile anemia rigenerativa (per processi immunomediati) Leucocitosi neutrofila e monocitaria con linfopenia ed eosinopenia (leucogramma da stress/infiammazione) Leucopenia Eventuale trombocitopenia	Citofluorimetria per la ricerca di anticorpi antieritrociti  Esame citologico del midollo osseo Profilo coagulativo completo (ad es., aumento FDP* e decremento AT*) Ricerca coinfezioni (ad es. da <i>Ehrlichia canis</i> ) Citofluorimetria per la ricerca di anticorpi antiplastrine
<b>Profilo coagulativo di base</b>	Iperfibrinogenemia, possibile allungamento PT e aPTT	Profilo coagulativo completo (come sopra)
<b>Profilo biochimico</b>	Iperproteinemia, ipoalbuminemia, iperglobulinemia, alterato rapporto Albumina/Globuline Azotemia (valori elevati di urea [BUN] e creatinina sierici)  Aumento degli enzimi epatici	Proteine di fase acuta: CRP*, Hp*, SAA* (utili per il monitoraggio) Parametri lipidici (ipercolesterolemia) Elettroliti (ipokaliemia) Minerali Ca/P, Mg (iperfosforemia/ipermagnesiemia) Emogasanalisi (acidosi metabolica) Test di funzionalità epatica
<b>Elettroforesi delle sieroproteine</b>	Ipoalbuminemia, Aumento di globuline $\alpha_2$ e gammopatia polioligoclonale	Proteine di fase acuta: CRP*, Hp*, SAA* (utili per il monitoraggio)
<b>Analisi delle urine</b>	Urine isostenuriche (PS*:1008-1012) o scarsamente concentrate (<1030) Proteinuria (determinata con strisce reattive e PU/CU*)	SDS-AGE* urine (compatibile con leishmaniosi: proteinuria glomerulare o mista)

\* FDP=prodotti di degradazione di fibrina/fibrinogeno; AT=antitrombina III; CRP=Proteina C reattiva; Hp=aptoglobina; SAA= siero-amilide A; PS=peso specifico; PU/CU=rapporto proteina/creatinina urinarie; SDS-AGE= elettroforesi in gel d'agarosio-sodiododecilsolfato.

Tabella 3. Rilievi compatibili con LCan negli esami di laboratorio di base e di approfondimento (Castagnaro et al., 2007)

<b>Metodi diretti</b>
Osservazione microscopica (macchia di Giemsa) Coltura in mezzi specifici Inoculazione sperimentale in animali suscettibili Xenodiagnosi
<b>Metodi indiretti</b>
Tecniche immunoistochimiche (immunoperossidasi, anticorpi monoclonali, ecc.) Ibridazione con sonde di DNA Reazione a catena della polimerasi
<b>Immunodiagnosi</b>
Immunità cellulare (test cutaneo alla leishmanina) Immunità umorale Immunodiffusione Controimmuno-elettroforesi Tecniche di agglutinazione (emagglutinazione indiretta, test di agglutinazione al lattice, test di agglutinazione diretta) Test di immunofluorescenza indiretta degli anticorpi ELISA, dot-ELISA, ELISA con antigeni ricombinanti Western blot Test immunocromatografici

Tabella 4. Metodi diagnostici per la Leishmaniosi canina. (Alvar et al., 2004)

I saggi più utilizzati sono:

- il rilevamento di anticorpi specifici nel siero (IgG) utilizzando preferibilmente tecniche sierologiche quantitative, come il test di immunofluorescenza degli anticorpi (IFAT) e la prova di immunoassorbimento mediante anticorpi enzima dipendenti (ELISA).
- i saggi basati sull'immunocromatografia sono facili da usare e forniscono rapidi risultati qualitativi sul momento, ma le loro prestazioni non sono ancora ottimali.
- i test basati sul rilevamento del DNA del cinetoplasto (kDNA) sembrano essere i più sensibili per il rilevamento diretto nei tessuti infetti.
- la PCR in tempo reale permette la quantificazione della carica di parassiti della *Leishmania* nei tessuti di cani infetti, che è utile per la diagnosi e il follow-up durante il trattamento (Mettler et al., 2005; Ferroglio et al., 2007).

La maggior parte delle diagnosi sono solo genere-specifiche, essendo basate sui sintomi, sull'identificazione microscopica dei parassiti in strisci di tessuto o fluido colorati con Giemsa e sierologia. Di conseguenza, l'identità di alcuni agenti causali è stata conosciuta solo in tempi relativamente recenti, in seguito alla tipizzazione eseguita durante limitate indagini ecoepidemiologiche. Per esempio, si pensava che tutti i casi di leishmaniosi cutanea in Europa fossero causati da *L. tropica*, fino a quando Rioux e Lanotte hanno riportato *L. infantum* come agente causale nella regione mediterranea occidentale. Lo zimodema MON-1 di *L. infantum*, responsabile della maggior parte dei casi di leishmaniosi viscerale nel bacino del Mediterraneo, è anche lo zimodema predominante isolato dai cani (Dantas-Torres, 2007). Rioux e Lanotte hanno usato l'elettroforesi enzimatica multi-locus (MLEE), che rimane la tecnica più utilizzata per identificare le specie e i ceppi di *Leishmania* (Ready PD, 2010).

Per identificare il parassita o la risposta dell'organismo verso di esso devono essere integrati tra loro diversi metodi di diagnosi eziologica. La positività del midollo o degli organi linfoidi, infatti, non è sempre indice di infezione persistente, né tantomeno permette di ascrivere a *Leishmania* gli eventuali segni clinici rilevati. Al contrario, l'identificazione del parassita all'interno di organi che presentino lesioni compatibili con leishmaniosi permette di stabilire con buona probabilità una relazione causa-effetto tra parassita e lesioni (Castagnaro et al., 2007).

La diagnosi della leishmaniosi canina, comunque, non differisce sostanzialmente da quella dell'uomo; in entrambi i casi, i dati clinici, epidemiologici, parassitologici e biochimici ottenuti devono essere considerati nel loro complesso (Alvar et al., 2004).

## Metodi diretti

Una metodica consiste nell'osservazione diretta del parassita in strisci colorati o dopo la coltura di campioni, ottenuti per lo più da linfonodi poplitei o dal midollo osseo, ma anche dalla pelle o sul sangue periferico. Questi campioni sono ottenuti utilizzando metodi invasivi e, come regola generale, non sono utili per il rilevamento del parassita nei cani asintomatici (Castelli et al., 2021).

## Microscopia (metodo Giemsa)

Il campione viene utilizzato sia per la preparazione del vetrino, colorato convenzionalmente con Giemsa o attraverso il metodo Romanowsky per rivelare gli amastigoti, e per la coltura nel terreno di Novy-McNeal-Nicolle (NNN).

L'osservazione microscopica di uno striscio di midollo osseo è più sensibile dell'esame linfonodale (60-75% rispetto al 40-50%), ma dipende dal carico di parassiti, che è associato alla gravità della malattia. Anche se la coltura aumenta la sensibilità di quasi il 20%, la difficoltà di adattare questo terreno isolato al mezzo, il ritardo nell'ottenere un risultato e la frequenza di contaminazione fanno sì che il metodo sia raramente usato per la diagnosi primaria. È più adatto agli studi epidemiologici, in cui l'identificazione biochimica richiede l'isolamento del parassita (Alvar et al., 2004).

Negli strisci colorati con Giemsa, gli amastigoti si possono trovare liberi o intracellulari all'interno di monociti, macrofagi e neutrofili e sono presenti come corpi ovali o rotondi con 2-4  $\mu\text{m}$  di diametro (Figura 15). Il loro citoplasma appare blu chiaro, con un nucleo relativamente grande che si colora di rosso (Maia et Campino, 2008).

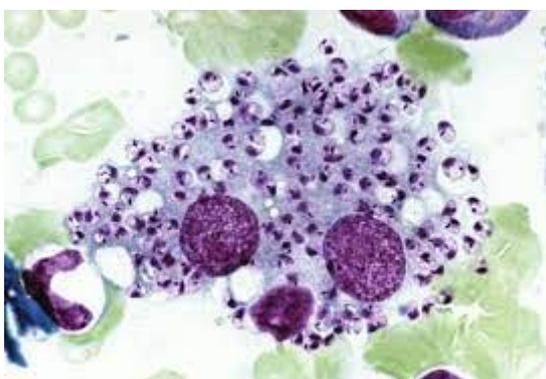


Figura 15. Amastigoti di *Leishmania infantum* in un macrofago canino (Baneth et al., 2018)

Secondo Ferrer (1999) e Alvar et al. (2004), gli strisci di midollo osseo e di linfonodo, osservati al microscopio, presentano una sensibilità del 60-75% e del 30-50%, rispettivamente. Tuttavia, in uno studio condotto da Rosypal et al. (2005), gli amastigoti sono stati trovati e osservati nel 93% dei campioni di midollo osseo e linfonodi infettati naturalmente da *L. infantum*; peraltro, in cani infettati sperimentalmente, si evidenziava nei campioni di midollo osseo una probabilità maggiore di trovare *Leishmania* rispetto agli aspirati di linfonodi.

La densità dei parassiti nello striscio può essere stimata contando il numero di amastigoti in relazione alla conta dei globuli bianchi. Si può applicare una scala logaritmica che va da 0 (senza parassiti) a +6 (più di 100 parassiti per campo microscopico) (Maia et Campino, 2008). Liarte et al. (2001) hanno anche descritto un altro metodo diretto e più veloce: il Quantitative Buffy Coat (QBC1) che è un metodo fluorescente e presenta un'alta sensibilità per il rilevamento degli amastigoti nel sangue periferico di cani infettati da CanL. Si esegue prima la separazione dei globuli bianchi mediante centrifugazione e grazie all'uso di una provetta da microematocrito rivestita con un colorante per il DNA (arancio di acridina più ossalato di potassio), gli amastigoti vengono visualizzati utilizzando un microscopio fluorescente nel 97 % degli animali considerati positivi alla sierologia e nel 100% dei cani con parassiti presenti in altri tessuti (Maia et Campino, 2008).

Un'altra tecnica che si avvale sempre di un costoso microscopio a fluorescenza è quella sviluppata da Cenini et al. (1989), i quali sostenevano che la vitalità degli amastigoti poteva

essere controllata attraverso un conteggio differenziale delle forme vive e morte. Dopo aver colorato gli amastigoti con fluoresceina diacetato e bromuro di etidio sotto la luce blu, i parassiti vivi diventavano fluorescenti in verde, mentre quelli morti si coloravano di arancione. Questa tecnica sarebbe utile per il follow-up del trattamento.

## Esame colturale

È il test più specifico perché lo sviluppo in coltura di promastigoti vitali è unicamente ascrivibile al genere *Leishmania* qualora si tratti di campioni prelevati in aree endemiche del Vecchio Mondo. Ha però lo svantaggio di richiedere tempi lunghi d'esecuzione e può essere eseguito solo presso i laboratori specializzati di alcuni Istituti Zooprofilattici Sperimentali (Castagnaro et al., 2007).

La coltura in vitro di diversi tessuti può migliorare la sensibilità del rilevamento del parassita. Non tutti i ceppi di *Leishmania* crescono alla stessa velocità e non tutti i tessuti e organi dello stesso cane hanno un carico di parassiti simile. L'inoculazione ripetuta di diverse provette può portare a un aumento della sensibilità diagnostica (Evans, 1989).

I mezzi di coltura utilizzati possono essere monofasici come mezzo per insetti di Schneider, M199, RPMI, Grace mezzo o difasico come Novy-McNeal-Nicolle o Brain Heart Infusion.

I terreni di coltura vengono inoculati con una o due gocce di aspirato o un frammento d'organo omogeneizzato o polverizzato e incubato a una temperatura compresa tra 22°C e 26°C. Nelle colture positive, i promastigoti possono essere visti dalla prima settimana.

In uno studio eseguito da Maia et al. (2007), il 77,1% delle colture da campioni di milza, linfonodi e midollo osseo raccolti post mortem è diventato positivo nella prima settimana e il 23% nella 2a-3a settimana, rafforzando la necessità di continuare la coltura almeno fino alla terza settimana. In generale, le colture diventano negative dopo quattro settimane.

Secondo Madeira et al. (2006) e Maia et al. (2007) milza, linfonodi e midollo osseo sono i materiali biologici con un più alto tasso di colture positive. A causa dei soddisfacenti risultati della coltura di milza, alcuni autori (Barrouin-Melo et al., 2005; Rosypal et al., 2005) hanno sostenuto l'uso di milza come organo di scelta per la diagnosi parassitologica dell'infezione da *Leishmania*. Tuttavia, la procedura per raccogliere il materiale biologico è invasiva e ciò rappresenta un motivo valido per evitarla, utilizzando invece l'aspirato di linfonodo popliteo; se, però, il linfonodo non è ben rilevabile, il midollo osseo è un'ottima alternativa.

Anche se specifiche al 100%, le colture sono sempre meno utilizzate per la diagnosi a causa dei loro svantaggi:

- il ritardo nel risultato
- la suscettibilità alla contaminazione microbiologica
- la dipendenza dal carico di parassiti
- la difficoltà di esecuzione a causa di scarso adattamento dell'isolato al mezzo

(Maia et Campino, 2008).

## Inoculazione del parassita in animali da laboratorio

La presenza del parassita può essere dimostrata dopo l'inoculazione del criceto dorato (*Mesocricetus auratus*) (Moreira et al., 2016). L'inoculazione animale non è solitamente impiegata come test diagnostico, poiché possono essere necessari diversi mesi per ottenere un risultato.

Dopo l'inoculazione, l'animale viene esaminato settimanalmente per verificare i segni di infezione, come l'epatosplenomegalia. Gli amastigoti possono essere raccolti dal sangue periferico (Maia et Campino, 2008).

## Xenodiagnosi

La xenodiagnosi è un metodo molto sensibile, ma di scarsa applicabilità pratica e può essere effettuata solo in laboratori specializzati, poiché ha bisogno di una colonia ben strutturata (Castagnaro et al., 2007). Tuttavia, può essere uno strumento epidemiologico molto utile per studiare la storia naturale della leishmaniosi canina.

Questa tecnica per il rilevamento e l'isolamento di un patogeno consiste nell'anestetizzare il cane sospetto e inserire la sua testa all'interno di una gabbia dove vi sono, appunto, i flebotomi che si nutriranno direttamente sul cane. In seguito, i flebotomi verranno esaminati nei giorni successivi per la presenza di promastigoti nel tratto intestinale (Maia et Campino, 2008).

L'infettività dei cani alle diverse specie di *Leishmania* è stata studiata approfonditamente nel bacino del Mediterraneo usando esemplari dei vettori altamente competenti di *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* (Rioux et al., 1972; Gradoni et al., 1987; Molina et al., 1994).

Il tasso di infezione di *Phlebotomus* riportato da diversi autori (Gradoni et al., 1987; Molina et al., 1994) varia tra il 21,9% e il 92% mentre l'infezione di *Lutzomyia longipalpis* varia dal 13% al 29% (Sherlock, 1996). Travi et al. (2001), in seguito, hanno postulato che questa discrepanza potrebbe essere dovuta al fatto che la soglia di parassiti per infettare *P. perniciosus* è inferiore a quella necessaria per infettare *L. longipalpis* o perché i cani in Europa, a causa di una migliore nutrizione, rimangono asintomatici nonostante abbiano un carico di parassiti più elevato rispetto ai cani denutriti dell'America Latina, e di conseguenza risultano essere più infettivi per *P. perniciosus*.

## PCR

Ad ogni modo, la tecnica che ha avuto il maggior successo, grazie alla sua straordinaria sensibilità e specificità, è la reazione a catena della polimerasi (Polymerase chain reaction, PCR), con tutte le sue varianti.

La PCR permette di amplificare sequenze specifiche del genoma di *Leishmania*. È un metodo molto sensibile, soprattutto se va ad amplificare sequenze genomiche "multicopia" (presenti in numero elevato in ogni singolo parassita, quali il DNA dei minicircoli del cinetoplasto). È quindi in grado di identificare piccolissime quantità di DNA dei protozoi presenti nel materiale biologico esaminato (Castagnaro et al., 2007). Può essere effettuata su DNA genomico o cinetoplasto del parassita, nei vari tessuti lesionati. Comunque, in caso d'infezione generalizzata, i diversi tessuti (in ordine decrescente di sensibilità: midollo, linfonodo, cute, congiuntiva, sangue periferico) forniscono ottime probabilità di identificare il DNA degli eventuali parassiti presenti (Maia et al., 2006).

Secondo Maia et al. (2007), la PCR eseguita esaminando il linfonodo è utile come diagnosi primaria di prima linea o follow-up terapeutico; mentre per i cani senza linfonodo popliteo rilevabile, ci si serve della PCR a livello del midollo osseo. Più recentemente alcuni autori hanno

difeso l'uso di tamponi congiuntivali per la diagnosi e il follow-up del trattamento (Ferreira et al., 2008).

Il DNA di *Leishmania* è stato trovato anche in diversi altri campioni biologici non regolarmente utilizzati per la diagnosi di routine, come sangue, polmone, cuore, pene, vagina, testicolo, sperma, utero, placenta, rene, intestino, latte e urina (Serenio et al., 2020).

Negli ultimi anni, la diagnosi si sta direzionando verso l'utilizzo di campioni biologici periferici sia a causa di un'esecuzione più semplice, sia per una maggiore accettabilità da parte dei proprietari rispetto alla raccolta più invasiva di biopsie, come midollo osseo o linfonodo.

La sensibilità e la specificità della PCR dipendono da una serie di fattori tra cui:

- i primer
- il numero di copie del bersaglio
- il metodo di estrazione del DNA
- il materiale della biopsia
- il protocollo

(Alvar et al., 2004).

Le tre tecniche di PCR più utilizzate sono:

- PCR convenzionale o tradizionale: Il DNA di *Leishmania* è amplificato usando una coppia di primers (sequenze di basi complementari alla sequenza bersaglio contenuta nel DNA di *Leishmania*);
- PCR "Nested": è un metodo più sensibile ma meno specifico della PCR tradizionale, in quanto aumentando il numero di passaggi, tende ad aumentare il rischio di contaminazione da parte di DNA estraneo e, quindi, di risultati falsi positivi; è una tecnica molto rapida, non si serve di materiali radioattivi ed è teoricamente in grado di rilevare il DNA di 0,01 parassiti (Cruz et al., 2002).
- PCR quantitativa ("real-time" o qPCR): grazie all'utilizzo di sonde fluorescenti, è possibile quantificare il numero di copie di DNA presenti nel campione biologico. Ha una sensibilità simile alla PCR "Nested", ma è più specifica perché il campione subisce un numero minore di manipolazioni ed è quindi meno soggetto a contaminazioni.

Secondo dati preliminari recentemente pubblicati, può inoltre fornire informazioni (ad es., numero di parassiti presenti) utili in fase di monitoraggio, per cui potrebbe valere la pena utilizzare da subito questo approccio, nel caso fosse offerto dal laboratorio di riferimento.

(Castagnaro et al., 2007)

La PCR in tempo reale presenta dei vantaggi rispetto alla PCR standard (Figura 16):

- una riduzione del tempo di analisi
- un ridotto rischio di contaminazione
- una maggiore sensibilità.

La PCR quantitativa facilita il monitoraggio della carica parassitaria durante e dopo il trattamento in diversi campioni permettendo la previsione di recidive associate al tessuto carico di parassiti residui dopo il trattamento (Maia et Campino, 2008)

È stato verificato che la guarigione clinica non è necessariamente parallela all'eradicazione dei parassiti e che una percentuale significativa di cani clinicamente guariti recupera la capacità di infettare il flebotomo alcuni mesi dopo il trattamento, o può anche mantenere questa

capacità per tutto il tempo, anche se la percentuale di vettori infetti è ridotta significativamente (Alvar et al., 2004). D'altra parte, durante la stagione di trasmissione i falsi positivi possono anche verificarsi a causa di una contaminazione naturale o di un'infezione transitoria.

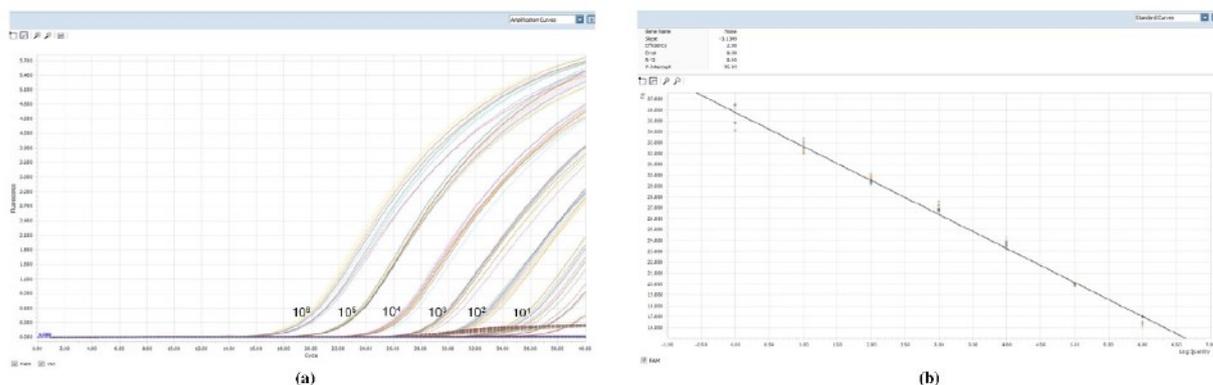


Figura 16. Prestazioni tecniche e range di rilevamento del test q PCR di *Leishmania infantum*.

In (a) il DNA è stato estratto da diluizioni seriali di *L. infantum* in coltura, da  $1 \times 10^6$  a 1 *Leishmania*/mL. Le curve di amplificazione sono mostrate per ogni diluizione, con ogni concentrazione di parassiti;

(b) i valori Ct medi sono tracciati da dieci test contro diluizioni seriali contenenti *L. infantum* per reazione. Ogni punto rappresenta il Ct di un singolo campione, con il grafico dei valori Ct ed equivalente del parassita si adatta a una funzione lineare ( $R^2 = 0,99$ ) (Castelli et al., 2021).

Va però ricordato che, nei cani resistenti, l'inoculazione di *Leishmania* può non essere seguita da disseminazione del parassita; quindi, un'eventuale positività cutanea in assenza di lesioni cutanee in area endemica non significa necessariamente che il cane sia infetto e sviluppi infezione e allo stesso modo, eventuali positività midollari possono poi essere seguite da negativizzazione.

In linea di massima, è sempre meglio utilizzare materiale fresco o congelato o fissato in alcol etilico al 95%. L'utilizzo di campioni fissati in formalina e paraffina fornisce rese diagnostiche peggiori, ma è in ogni modo utilizzabile. È quindi consigliabile richiedere l'esecuzione di questo esame al laboratorio in quei casi in cui le indagini citologiche e istologiche cutanee risultino negative pur in presenza di un forte sospetto diagnostico (Castagnaro et al., 2007)

## Metodi indiretti

### Tecniche immunoistochimiche (IHC)

Quando permane il forte sospetto di LCan, nonostante un esame citologico negativo, è sempre consigliabile ricorrere a un esame istologico, soprattutto in presenza di dermatiti e nelle forme cutanee caratterizzate da lesioni focali.

Il parassita può essere evidenziato in sezioni allestite da lesioni, colorate con ematosilina-eosina (HE). In associazione al parassita, possono essere anche evidenziate le alterazioni compatibili con LCan, rappresentate da infiammazioni linfoplasmacellulari o granulomatose e/o vasculiti a carico di diversi organi, dermatopatie ischemiche, dermatiti linfoplasmacellulari dell'unione dermo-epiteliale, iperplasia linfoide a carico di milza e linfonodi.

Nel caso si rilevino alterazioni istologiche quali quelle sopra descritte, ma non fosse possibile identificare il parassita in sezioni colorate con ematosilina-eosina, sarà opportuno procedere con colorazioni immunoistochimiche utilizzando anticorpi diretti contro antigeni di *Leishmania*.

Qualora anche questo approccio risulti negativo, il campione bioptico può essere utilizzato per la ricerca del genoma di *Leishmania* mediante PCR, come descritto precedentemente (Castagnaro et al., 2007).

Oltre ai metodi diretti, esistono anche tecniche di rilevamento indiretto, specialmente tecniche immunoistochimiche come l'immunoperossidasi o l'immunofluorescenza diretta dei tessuti, che evidenziano gli amastigoti sullo sfondo attraverso una colorazione specifica del parassita.

Questi approcci immunoistochimici (IHC) possono essere utilizzati come strumento supplementare per confermare la diagnosi su HE (analisi istopatologica di organi infetti colorati con ematossilina ed eosina, usata anche per rilevare la presenza di parassiti), in particolare in organi che non hanno un alto carico di parassiti. Il metodo *Leishmania* IHC per il rilevamento di amastigoti in tessuti fissati in formalina e in paraffina può essere applicato utilizzando il sistema streptavidina-perossidasi/biotina con siero iperimmune canino come anticorpo primario o mediante l'uso di anticorpi policlonali o monoclonali anti-*Leishmania* (Tafari et al., 2004). Xavier et al. (2006), utilizzando campioni bioptici di pelle da diverse regioni anatomiche, hanno ottenuto una maggiore sensibilità con l'IHC che con l'HE.

I metodi microscopici, istopatologici e immunoistochimici possono anche dare risultati falsi negativi perché la loro sensibilità dipende dal carico di parassiti, o risultati falsamente positivi perché altri artefatti visti con la microscopia ottica possono essere erroneamente considerati come amastigoti (Gomes et al., 2008).

## Immunodiagnosi

### Immunità cellulare

I test per valutare la risposta immunitaria cellulare alla *Leishmania* nei cani sono meno numerosi e meno standardizzati rispetto alle tecniche sierologiche e di solito non vengono usati come strumenti diagnostici.

Un test pratico e standardizzato per valutare la risposta immunitaria cellulare sarebbe certamente applicabile in clinica sia per monitorare l'evoluzione della leishmaniosi e la risposta al trattamento, sia per aiutare a stabilire una prognosi.

### Test di Montenegro (o alla Leishmanina)

Il Montenegro o test cutaneo alla leishmanina (LST), indica l'ipersensibilità di tipo ritardato all'antigene di *Leishmania* e consiste in un'inoculazione intradermica di una sospensione di promastigoti inattivati diluita in fenolo. Come controllo, il diluente della leishmanina viene iniettato in un sito diverso sulla pelle.

Una lettura positiva a 48 h o 72 h è un indurimento di oltre 5 mm di diametro (Cardoso et al., 1998).

Durante la malattia attiva, la LST è negativa, mentre è positiva durante un'infezione subclinica (auto-guarigione), la fase iniziale della leishmaniosi viscerale o dopo un trattamento efficace.

È un test molto semplice e poco costoso, il che lo rende appropriato per il lavoro sul campo che coinvolge un gran numero di animali. Tuttavia, risulta essere anche svantaggioso sia per quanto riguarda la necessità di follow-up dopo 48-72 h, sia per la putativa induzione iatrogena di risultati falsi positivi dopo ripetuti test LST (Maia et Campino, 2008).

## Immunità umorale

La diagnosi sierologica è ampiamente e frequentemente utilizzata ma, sebbene la risposta umorale specifica nella leishmaniosi canina sia, in generale, molto intensa con alti livelli di immunoglobuline specifiche, essa sottostima il tasso di infezione di *Leishmania* nelle popolazioni di cani provenienti da aree endemiche. Anche se la produzione di anticorpi è bassa nella fase iniziale e tardiva o in infezioni asintomatiche, i cani infetti di solito sviluppano titoli anticorpali gradualmente crescenti nel tempo. I cani sintomatici, oltre alle alterazioni ematologiche e proteiche, sviluppano una forte risposta umorale. Tuttavia, la presenza di anticorpi anti-*Leishmania* da sola non è un segno conclusivo di malattia. Pertanto, è consigliabile eseguire più di un test sierologico per migliorare la diagnosi di CanL e continuare monitoraggio con test ripetuti dopo 3 mesi (Alvar et al., 2004). Infatti, la determinazione della sottoclasse IgG non è generalmente usata nella diagnosi. La maggior parte degli studi sulla produzione di immunoglobuline nei cani si sono concentrati sulla risposta IgG1 e IgG2 e hanno cercato di collegare i livelli di sottoclassi *Leishmania*-specifiche con le cellule T-helper di tipo 2 di suscettibilità e Th1-like protettivo, rispettivamente.

Secondo Day (2007), i risultati contrastanti di diversi studi che hanno messo in discussione se i cani infetti sviluppavano sottoclassi IgG standardizzate, potrebbero essere legati alla specificità degli antisieri policlonali disponibili in commercio utilizzati per rilevare queste sottoclassi. Risultati più significativi potrebbero essere ottenuti utilizzando il pannello di anticorpi monoclonali con specificità ben convalidata per tutte e quattro le sottoclassi di IgG canine.

Iniesta et al. (2005) hanno scoperto che le IgE erano espresse solo da animali che sviluppavano la patologia, il che indicava il suo ruolo potenziale come marker della malattia attiva. Reis et al. (2006) hanno anche trovato una forte correlazione tra IgE e la sintomatologia.

Le IgA sono state rilevate anche in cani sintomatici e a causa del ruolo che queste giocano nell'immunità delle mucose, la produzione di questo isotipo in CanL può sorgere quando *Leishmania* si diffonde a diversi tessuti, comprese le superfici mucosali.

I saggi sierologici hanno diversi problemi intrinseci, tra cui la persistenza di anticorpi specifici dopo il recupero o le reazioni incrociate con anticorpi contro altri patogeni come *Trypanosoma cruzi* ed *Ehrlichia canis*. Alti livelli di sensibilità e specificità sono necessari per evitare risultati falsi negativi che sottostimano il tasso di infezione da *Leishmania* nelle popolazioni di cani in aree endemiche, così come le reazioni falsamente positive che possono portare all'eutanasia non necessaria di cani non infetti (Maia et Campino., 2008).

## IFAT

Il test di immunofluorescenza indiretta degli anticorpi (IFAT) che è considerato il "gold standard" della diagnosi sierologica, viene eseguito ponendo il siero in esame su vetrini su cui sono presenti promastigoti di *Leishmania*. Gli anticorpi eventualmente presenti si legano ai promastigoti e la positività viene evidenziata utilizzando anti-anticorpi fluorescenti. In questo

caso è anche possibile determinare il titolo anticorpale utilizzando diluizioni del siero in esame. La sensibilità e specificità dell'IFAT sono prossime al 100% e per tale motivo il test viene considerato dall'Organizzazione Internazionale delle Epizootie (OIE) il metodo sierologico di riferimento (Gradoni et Gramiccia, 2000).

Questo test è utile negli studi epidemiologici, nella pratica e anche nel follow-up del trattamento (Alvar et al., 2004).

Per quanto riguarda ELISA ed IFAT, è opportuno accertarsi che il laboratorio di riferimento esegua sempre delle titolazioni "end point" cioè fino all'ultima diluizione positiva e non semplicemente fino ad un predeterminato valore soglia di positività. Sebbene non sempre il titolo anticorpale sia correlato alla gravità dei segni clinici (soprattutto per valori medio-bassi), in linea di massima la determinazione del titolo anticorpale permette di differenziare i cani infetti ma non malati, che avranno tendenzialmente un titolo basso, da quelli malati e con disseminazione del parassita, che avranno un titolo tendenzialmente elevato.

La definizione di titolo "basso" o "elevato" va sempre rapportata alle soglie di positività riportate dal laboratorio di riferimento.

Come in molte altre malattie infettive è opportuno considerare come "elevati" solo i titoli che si discostino di molto rispetto al valore soglia di positività del laboratorio di riferimento (ad es., se il laboratorio considera "positivo" un titolo uguale-superiore a 1:80 si considera "elevato" un titolo superiore a 1:640) (Castagnaro et al., 2007). Tuttavia, la sua applicazione richiede un alto livello di abilità ed esperienza e strutture di laboratorio costose.

Un'altra delle sue limitazioni è il fatto che devono essere eseguite molte diluizioni di siero, il che rende il test laborioso e non pratico per lo screening di un certo numero di campioni. Sono disponibili alcuni kit commerciali per IFAT canini, ma le preparazioni di antigene fatte in laboratorio sono solitamente più efficaci. I campioni in cui i parassiti mostrano un'omogenea fluorescenza verde sono considerati positivi, mentre quelli in cui si osserva una colorazione rossa opaca sono considerati negativi.

L'IFAT è molto utile dal punto di vista clinico, ma sottostima il tasso di infezione di *Leishmania* nelle popolazioni di cani in aree endemiche. Si possono verificare diverse situazioni possibili, descritte di seguito:

- a. Cani sintomatici con sierologia fortemente positiva. Il 90-95% delle diagnosi vengono effettuate senza difficoltà, il cane ha una sintomatologia e sierologia positiva; si tratta di cani da cui è molto facile isolare il parassita.
- b. Cani con sierologia dubbia o negativa ma chiari segni di malattia. Circa il 5% di tutti i casi di leishmaniosi canina rientrano in questo gruppo. Può essere necessario adattare le tecniche diagnostiche o, più eccezionalmente, può essere un problema immunologico a causa di un deficit di risposta umorale. Il test cutaneo è negativo.
- c. Cani asintomatici con titoli anticorpali alti, bassi o negativi. Questi cani hanno generalmente titoli anticorpali fluttuanti ed è relativamente facile isolare i parassiti dai linfonodi o dal midollo osseo. I cani in questa categoria svilupperanno la malattia dopo un periodo di prelatenza relativamente lungo.
- d. Cani resistenti senza segni di malattia. Questi sono caratterizzati dall'aver una sierologia bassa o non positiva e titoli fluttuanti, con un test cutaneo positivo e alti livelli di IFN- come espressione di una risposta protettiva delle cellule Th1. L'isolamento del parassita è difficile, l'infezione è generalmente rilevabile solo con l'aiuto della PCR. Il cane può rimanere in questa situazione a tempo indeterminato o può sviluppare una severa leishmaniosi se qualche altro fattore concomitante (un'altra infezione, età, ecc.)

causa la perdita dell'immunità cellulare; l'esame di un secondo campione di siero non chiarisce normalmente la situazione ed è necessario effettuare un test cutaneo alla leishmanina e cercare di isolare il parassita.

- e. Reazioni incrociate. Può succedere che il cane non sia infetto e abbia un basso titolo anticorpale a causa di una reazione incrociata con altre infezioni (per esempio babesiosi o tripanosomiasi) o perché ha avuto contatto con la *Leishmania* ma l'infezione non è progredita; un secondo campione di siero o l'uso di un'altra tecnica diagnostica può chiarire la situazione. Queste sono le reazioni false positive.

Quando viene effettuata un'indagine sieroepidemiologica, circa la metà dei cani con sierologia positiva sono solitamente asintomatici. Questi sono i cani che appartengono ai gruppi (c), (d) o (e), o quelli in fase di sieroconversione. La corrispondenza tra i risultati sierologici e la conferma parassitologica dipende dalla tecnica utilizzata (Alvar et al., 2004).

## DAT

Il test di agglutinazione diretta (DAT) utilizza promastigoti interi e colorati come sospensione o in forma liofilizzata. È un test che viene effettuato su sangue o siero ed è economico e semplice da eseguire, il che lo rende ideale sia per l'uso sul campo che in laboratorio.

Presenta degli svantaggi, tra cui:

- il tempo di incubazione relativamente lungo (18 ore)
- le diluizioni di sangue o siero devono essere fatte, il che rende il test laborioso e non adatto allo screening di un gran numero di campioni
- si rilevano alte percentuali di false positività in presenza di sieri di cani affetti da altre patologie, come dermatiti aspecifiche, rogne, filariosi occulta, leptospirosi, borreliosi e toxoplasmosi (Mancianti, 2001).

Tuttavia, lo sviluppo di un antigene liofilizzato rende DAT molto adatto per l'uso in condizioni di campo difficili, poiché rimane stabile ad alte temperature (Maia et Campino, 2008).

## Test ELISA

È il Test di screening per eccellenza che consente la rilevazione degli anticorpi anti-*Leishmania* nel sangue, che deve essere raccolto in provette sterili; l'esame viene effettuato sul siero conservato ad una temperatura compresa tra +4°C e +8°C (<https://www.salute.gov.it/portale/sanitaAnimale/dettaglioContenutiSanitaAnimale.jsp?lingua=italiano&id=220&tab=1> data:18/11/2021).

Grazie a questo test, si analizza il siero che viene posto in piastre rivestite di antigeni di *Leishmania*. In caso di positività, si apprezza una reazione colorimetrica quantificabile spettrofotometricamente e quindi non soggetta a variabili legate all'operatore. È un test specifico e ha sensibilità medio alta (70-100%). La sensibilità è molto elevata quando vengono utilizzati test basati sull'associazione di più antigeni dei promastigoti, in modo da aumentare il numero di epitopi che possono fissare eventuali anticorpi presenti. Inoltre, permette di quantificare anticorpi specifici (Castagnaro et al., 2007).

Si possono verificare i seguenti risultati:

- Negativo: Il cane non dispone di anticorpi specifici contro *L. infantum*. Se è presente un forte sospetto che i segni clinici, le lesioni o alterazioni laboratoristiche siano

compatibili con questa infezione, si consiglia l'esecuzione di ulteriori indagini quali la citologia, l'istopatologia delle lesioni o la ricerca del parassita tramite metodiche di diagnostica molecolare (PCR) nei tessuti più sospetti.

- Dubbio: il comportamento dovrebbe essere identico a quello relativo ai cani sieronegativi. Inoltre, si consiglia di ripetere il test sierologico dopo 4-6 mesi per valutare un'eventuale variazione del livello anticorpale.
- Positivo: testimonia la presenza di anticorpi specifici contro *L. infantum*. L'interpretazione deve essere correlata al livello anticorpale e a tale fine abbiamo delineato tre categorie di positività

(<https://www.clinicaveterinariasanmarco.it/diagnosi-sierologica-di-leishmaniosi-con-la-metodica-elisa/> data:17/11/2021)

## Western blot (WB)

È una tecnica più sensibile dell'IFAT e anche dell'ELISA; tuttavia, poiché il processo di estrazione degli antigeni non è stato standardizzato, non è usato per la diagnosi primaria.

Non c'è ancora un accordo globale sul modello di banda correlato con infezione/malattia (Maia et Campino, 2008). I risultati del WB sono coerenti per ciascun laboratorio. La sequenza di apparizione di alcune bande può indicare la fase dell'infezione/malattia nel cane.

Il fatto che le tecniche sierologiche convenzionali usano come antigeni sia promastigoti completi che amastigoti o estratti solubili di questi, limita notevolmente la loro specificità. Per superare questo problema, diversi laboratori sono alla ricerca di geni e codici per gli antigeni di *Leishmania* che possono essere utilizzati per sviluppare metodi sierodiagnostici più specifici. La risposta anticorpale nella leishmaniosi canina è stata studiata utilizzando numerosi antigeni ricombinanti di *L. infantum*. Ma solo uno (antigene ricombinante K39) è stato ampiamente utilizzato nell'ELISA per dimostrare l'infezione da *Leishmania* nei cani e per studi di siero prevalenza. Il ricombinante antigene K39 contiene una sequenza ripetuta di 39 aminoacidi che formano un epitopo immunodominante in una "proteina legata alla chinesina" di *L. infantum*. È espresso prevalentemente negli amastigoti ed è altamente conservata tra le specie responsabili della leishmaniosi viscerale (Alvar et al., 2004).

Nell'immagine 17 verranno valutate e comparate tre delle tecniche più utilizzate.

## Prestazioni

Il test LEISHMANIA WB IgG è stato oggetto di uno studio comparativo con le tecniche IFA ed ELISA in un laboratorio indipendente.

- Sensibilità:

	IFA	ELISA	WB
POSITIVI	41	40	51
NEGATIVI	10	11	0

**Tabella 1:** 51 sieri di pazienti con attiva leishmaniosi viscerale evolutiva sono stati testati con 3 tecniche. ELISA e IFA hanno mostrato risultati falsi negativi soprattutto in soggetti immunodepressi (HIV).

	IFA	ELISA	WB
POSITIVI	0	0	15
NEGATIVI	20	20	5

**Tabella 2:** 20 sieri provenienti da soggetti sani che vivono in un'area endemica e con test cutaneo positivo sono stati testati in parallelo nelle tre tecniche: la sensibilità di IFA ed ELISA è insufficiente per rilevare livelli molto bassi di anticorpi.

WB-LES vs11 it 150805

7

- Specificità:

	IFA	ELISA	WB
POSITIVI	0	0	0
NEGATIVI	30	30	30

**Tabella 3:** 30 sieri provenienti da adulti sani che vivono in zone non endemiche sono stati testati in parallelo con immunoblot in ELISA e IFA in un laboratorio indipendente: la specificità delle tre tecniche è stata del 100%. NB: le reazioni false-positive vengono frequentemente riscontrate indipendentemente dalla tecnica nei pazienti affetti da tripanosomiasi (T. cruzi).

Figura 17. Comparazione delle tecniche IFA, test ELISA e Western blot. (<https://fgmdiagnostici.it/files/64.pdf>).

## Immunocromatografia

I kit di test rapidi immunocromatografici sono molto attraenti per il loro formato a test singolo, la facilità d'uso e i tempi di risposta molto rapidi che consentono un immediato responso da parte del veterinario, ma non risultano essere molto affidabili.

Un test immunocromatografico che utilizza l'antigene rK39 è disponibile in commercio sotto forma di strisce impregnata di antigene, adattata per l'uso in condizioni di campo. La comparsa di due linee (un controllo e un test, indipendentemente dall'intensità della colorazione; vedi Figura 18) indica un risultato positivo. Il risultato di un dipstick non è considerato valido se il controllo non è colorato.

Alcuni autori hanno valutato il dipstick rK39 vantaggioso in quanto rapido, semplice e non richiede un'ampia formazione dell'operatore (Reithinger et al., 2002; Rosypal et al., 2005).

Tuttavia, altri si sono trovati in disaccordo a causa della necessaria conservazione a freddo del tampone, l'impossibilità di conservare le strisce reattive a temperature ambientali elevate e l'impossibilità di eseguire il test con campioni di sangue intero; ciò limita il suo utilizzo per la sierodiagnosi della leishmaniosi viscerale (Schallig et al., 2002).

Per Reithinger et al. (2002) lo svantaggio principale del dipstick rK39 è la sua specificità molto bassa (61-75%), che porta ad un'alta proporzione di cani che vengono diagnosticati come falsi positivi.

Al contrario, Mettler et al. (2005) hanno concluso che il dipstick rK39 è utile per confermare casi clinicamente sospetti a causa della sua alta specificità in animali sintomatici.



Figura 18. Test immunocromatografico rapido per la determinazione di Anticorpi anti-Leishmania nel sangue nei cani (<https://www.biolab-srl.it/prodotti/leishmania/> data:02/11/2021).

# PREVENZIONE

Il controllo della leishmaniosi è importante a causa delle gravi conseguenze nei cani infetti e del suo carattere zoonotico. Una corretta prevenzione consente di evitare di intraprendere protocolli terapeutici anche complessi, costosi e in alcuni casi di scarso successo. Inoltre, le misure di controllo individuali possono avere scarsissimo impatto sull'epidemiologia della malattia se un'alta percentuale della popolazione canina (oltre a cani di proprietà, cani randagi e canidi selvatici) non viene interessata da tali misure. Prima di scegliere qualsiasi azione di controllo, è importante considerare due fattori:

- Il modello epidemiologico della regione interessata. Per esempio, l'infezione si sta verificando in modo sporadico o enzootico?
- L'impatto della leishmaniosi canina sulla salute umana nell'area interessata (Gharbi et al., 2015).

È necessario definire i seguenti termini: cane esposto, cane infetto e cane malato, per evitare fraintendimenti (Castagnaro et al., 2007).

## Definizione di cane esposto

Vengono definiti "esposti" i cani clinicamente sani nei quali i test diagnostici cito-istologici, parassitologici e molecolari risultino negativi ma siano evidenziabili titoli anticorpali specifici, non superiori a quattro volte il valore soglia del laboratorio di riferimento. I cani esposti all'infezione da *L. infantum* sono solitamente soggetti che soggiornano o hanno soggiornato, durante una o più stagioni di trasmissione, in un'area dove è accertata la presenza di flebotomi.

## Definizione di cane infetto

Un cane infetto da *L. infantum* è un soggetto nel quale è dimostrabile la presenza del parassita, con metodi diretti (microscopia, coltura o PCR) e con metodi indiretti (messa in evidenza di anticorpi specifici). Nelle zone endemiche, la sola positività alla PCR, eseguita da materiale cutaneo in assenza di lesione, durante la stagione di trasmissione (giugno-ottobre), potrebbe essere non sufficiente a definire infetto un cane.

## Definizione di cane malato

Un cane infetto può essere definito "malato" quando mostra uno o più segni clinici indicativi di leishmaniosi (vedi pag. 33) oppure anche diversi da questi, purché risultino chiaramente correlabili all'infezione in atto.

Un cane infetto da *L. infantum* può essere definito malato anche se, in assenza di segni clinici rilevabili, mostra alterazioni ematologiche, ematobiochimiche ed urinarie riferibili alla leishmaniosi oppure se mostra una o più alterazioni di laboratorio, purché siano sicuramente correlabili con l'infezione in atto.

## Definizione di cane malato con quadro clinico grave

Un cane infetto da *L. infantum* può essere definito malato con quadro clinico grave se:

- è stato già sottoposto a uno o più trattamenti terapeutici con farmaci anti-*Leishmania* e non mostra una remissione della sintomatologia;
- è affetto da nefropatia proteinurica;
- è affetto da insufficienza renale cronica;
- è affetto da gravi malattie oculari che possano comportare la perdita funzionale e/o richiedano terapie immunodepressive;
- è affetto da gravi malattie articolari che possano invalidare la funzione motoria e/o richiedano terapie immunodepressive;
- è affetto da altre severe malattie concomitanti, di natura infettiva, parassitaria, neoplastica, endocrina o dismetabolica (Castagnaro et al., 2007).

Le misure di controllo di *L. infantum* dovrebbero mirare al serbatoio, identificando i cani infetti il più presto possibile e interrompendo la trasmissione ai flebotomi vettori, riducendo il numero di questi ultimi e prevenendo il loro contatto con gli esseri umani.

Il controllo della leishmaniosi canina e di conseguenza della prevalenza nei cani è fondamentale anche per ridurre il numero di casi di leishmaniosi viscerale umana. In generale, le strategie seguite comprendono la diagnosi precoce, il trattamento dei cani infetti, lo screening immunologico, l'irrorazione delle case con insetticidi e l'utilizzo di formulazioni insetticide da applicare ai cani per proteggerli dalle punture dei flebotomi. (Alvar et al., 2004). Si è ritenuto che un altro metodo di controllo diretto della diffusione potesse essere rappresentato dallo screening di massa e il conseguente abbattimento dei cani sieropositivi attraverso l'eutanasia. Questa metodologia è stata parecchio utilizzata in Brasile, ma in altri Paesi (come l'Italia) la gran parte della popolazione la considera inaccettabile e assolutamente non etica, in quanto il cane è considerato un membro della famiglia.

La prova principale contro l'approccio di abbattimento dei cani per controllare la leishmaniosi è il fallimento dei grandi programmi di eliminazione sistematica dei cani sieropositivi portati avanti negli anni passati che non hanno portato ad alcuna riduzione del numero di casi umani. Un'alta proporzione di cani dovrebbe essere sottoposta a eutanasia per ottenere un'efficace riduzione della trasmissione della malattia, e questo è spesso un obiettivo troppo ambizioso, soprattutto nei paesi sottosviluppati con risorse economiche limitate. Inoltre, la diagnosi per l'individuazione dei cani infetti può essere molto difficile: a volte la diagnosi sierologica produce falsi negativi. Infine, l'eliminazione dei cani sottoposti solo a diagnosi sierologica può avere effetti controproducenti: i cani infetti, una volta eliminati, verrebbero sostituiti da cani suscettibili che potrebbero, a loro volta, infettarsi in breve tempo (Vulpiani et al., 2011).

Le organizzazioni internazionali, come l'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale (OIE) e l'OMS, hanno un ruolo importante nello stabilire il quadro di programmi di controllo della diffusione di malattie, suggerendo varie opzioni e fornendo sostegno. Questi programmi di controllo dovrebbero essere stabiliti dopo aver considerato diversi interessi: quelli dell'animale stesso, del proprietario, del veterinario, della popolazione animale nel suo complesso, della salute pubblica in generale e quelli economici.

Di fatto, il programma di controllo di abbattimento in Brasile è fallito, a causa dell'alta incidenza e della gravità dell'infezione tra la popolazione canina, dei limiti del test diagnostico e dei ritardi tra la diagnosi e l'abbattimento (Gharbi et al., 2015).

Quindi, ricapitolando, i metodi di controllo diretto mirati ai cani infetti (presintomatici e sintomatici) potrebbero essere efficaci se solo fosse disponibile un test affidabile. Anche se di indubbia utilità nello screening di massa, l'IFAT non è un test altamente sensibile e specifico per rilevare l'infettività, così come risutano poco sensibili le biopsie cutanee.

L'uso della PCR quantitativa per la valutazione della carica di parassiti nella pelle potrebbe essere più informativo: ad oggi la rilevazione di anticorpi anti-*Leishmania* circolanti con un titolo sierologico  $\geq 1:160$  è il metodo di screening preferito per identificare i cani con una probabilità molto alta di essere infettivi e, quindi, degni di essere sottoposti a metodi di controllo diretto. È ovvio che tutti i cani (infettivi e non infettivi) dovrebbero essere sottoposti a metodi di controllo indiretto (repellenti e controllo ambientale) (Vulpiani et al., 2011).

Le misure preventive si basano sull'uso di prodotti veterinari registrati che sono stati convalidati sperimentalmente e tramite studi sul campo. Oltre alle polveri e agli spray usati in passato, sono disponibili in commercio degli insetticidi a base di piretroidi sintetici, permetrina o deltametrina, ottimi repellenti contro i flebotomi, in formulazioni spot-on o in forma di collare; prevengono nuove punture su cani già precedentemente infetti e riducono il rischio di infezione. Queste preparazioni offrono pertanto una varietà di alternative per soddisfare la protezione dei cani e le preferenze dei loro proprietari.

L'applicazione topica di prodotti contenenti piretroidi sintetici, da soli o in combinazione con altri insetticidi, risulta avere un efficace effetto anti-feeding e abbattente nei confronti del vettore, dimostrando inoltre un elevato indice di sicurezza nel cane (Gramiccia, 2011). Studi sperimentali di efficacia possono valutare gli effetti anti-feeding e abbattenti, ma non possono imitare fedelmente l'infezione naturale. Pertanto, l'efficacia di questi prodotti richiede anche l'attuazione di studi sul campo, che non sono sempre disponibili per ogni preparazione commerciale.

Poiché i siti di riproduzione dei flebotomi sono diversi (Vedi capitolo 1, paragrafo diffusione), i controlli ambientali delle larve hanno un valore pratico limitato.

Si stanno valutando metodi di controllo dello stadio adulto, come le esche selettive basate sull'alimentazione zuccherina di maschi e femmine (le Attractive Toxic Sugar Baits-ATSB), e l'uso al chiuso di reti insetticide a lunga durata (LLIN) trattate con permetrina per prevenire le punture dei flebotomi che completano l'approccio IRS (Indoor Residual Spraying) suggerito dall'OMS. Anche se esistono diverse strategie, la prima scelta per prevenire la leishmaniosi canina resta quella di utilizzare nei cani dei presidi rappresentati da formulazioni topiche biocide a base di insetticidi autorizzati (Product Type 18) o repellenti (Product Type 19) (come collari, spot-on e/o spray) durante il periodo in cui i vettori sono attivi.

In questi ultimi anni, stanno emergendo nuovi candidati per combattere il flebotomo, tra cui estratti naturali di piante a basso impatto sull'ambiente e sull'animale ospite. In parallelo, le autorità sanitarie e i professionisti coinvolti nella salute pubblica e animale (veterinari, medici,

entomologi ed epidemiologi) devono lavorare insieme in un approccio One Health per minimizzare l'infezione da *Leishmania*. I veterinari giocano un ruolo cruciale nel fare da collegamento tra le principali parti interessate e i proprietari di cani per garantire che questi ultimi agiscano in modo responsabile nell'usare repellenti come misura preventiva contro *L. infantum* (Galvez et al., 2018).

Altre misure preventive da considerare sono:

- tenere il cane in casa nei periodi dell'anno in cui è più presente il flebotomo, prevalentemente dal tramonto all'alba
- usare repellenti per ambienti domestici interni
- evitare di tenere legna nei pressi dell'abitazione o nei luoghi comuni di passaggio del cane poiché qui si crea un microhabitat favorevole al flebotomo (Solano-Galego, 2011).

Riassumendo, collari in PVC (cloruro di polivinile), spot-on e formulazioni spray agiscono efficacemente tramite:

- effetto anti-feeding: la presenza dell'insetticida sulla pelle e sul pelo dell'animale ha un forte effetto "repellente", sufficiente a disorientare e irritare l'insetto, con conseguente rapida interruzione o riduzione del pasto di sangue, riducendo al minimo il contatto dell'insetto con il cane
- effetto insetticida (abbattente): di solito il flebotomo, anche se disorientato e incapace di nutrirsi, rimane sulla cute dell'animale per un tempo abbastanza lungo, assorbendo una dose sufficiente per ottenere effetti tossici. Quindi, questi insetticidi topici non solo riescono a prevenire le punture del flebotomo e, di conseguenza, la trasmissione di *L. infantum*, ma possono anche ridurre il numero di flebotomi infettivi attraverso la loro eliminazione diretta (Vulpiani et al., 2011).

I collari hanno una durata d'azione più lunga rispetto alle formulazioni spot-on ma impiegano più tempo per diventare pienamente efficaci: circa il 90% dopo una settimana e il 100% dopo 2 settimane.

Al contrario, l'effetto di una preparazione spot-on inizia dopo circa 24 ore. Indipendentemente dal tipo di formulazione, si raccomanda di iniziare la prevenzione prima della stagione dei flebotomi. La durata d'azione di ogni prodotto è intesa come il tempo durante il quale l'effetto repellente è superiore all'80%. Poiché la durata dell'azione differisce anche per la stessa formulazione, gli intervalli di ripetizione non sono gli stessi per tutti i prodotti (Apostolopoulos et al., 2018).

I collari comunemente usati per la prevenzione della LCan in Europa sono impregnati di deltametrina e ostacolano l'alimentazione del flebotomo. Dovrebbero essere applicati per almeno 1-2 settimane prima di viaggiare in aree endemiche, o all'inizio della stagione dei vettori per i cani che vivono in regioni endemiche, per assicurare abbastanza tempo al piretroide da essere assorbito e distribuito sulla pelle dell'animale (Wylie et al., 2014).

I collari contengono un sistema a matrice polimerica capace di un continuo rilascio di principi attivi nel sito di contatto diretto diffondendosi su tutta la superficie cutanea attraverso i lipidi

e il pelo degli animali trattati. Ci sono due collari sul mercato che contengono piretroidi sintetici di tipo II: deltametrina (DEL) e flumetrina/imidacloprid (FLU/IMI):

- Il collare DEL è stato ampiamente convalidato per la sua efficacia protettiva contro i flebotomi nei cani in laboratorio e in studi di campo. Essendo confermata un'adeguata efficacia anti-feeding già dopo una settimana, il collare dovrebbe essere indossato preferibilmente almeno una settimana prima dell'esposizione al rischio. La sua prevenzione della puntura da parte del flebotomo è a lungo termine (5-6 mesi). DEL non viene assorbito per via sistemica e gli insetti sono esposti a questa sostanza attiva solo attraverso il contatto.
- Il collare FLU/IMI ha dimostrato sul campo di diminuire il rischio di infezione da *L. infantum* sia nei cani che nei gatti, ma l'efficacia del prodotto in termini di prevenzione delle punture di flebotomi non è stata ancora testata. Finora, i suoi effetti sono stati convalidati per durare da 7 a 8 mesi contro pulci, zecche e pidocchi. Come il DEL, il componente FLU è un piretroide sintetico di tipo II e un ectoparassitocida attivo, mentre l'IMI è un neonicotinoide sistemico. Questi collari a bassa dose di rilascio non hanno bisogno di essere sostituiti più di una volta all'anno in aree temperate come il bacino del Mediterraneo, dove i flebotomi adulti sono assenti durante i mesi freddi (Galvez et al., 2018)

Gli insetticidi applicati direttamente, invece, sono disponibili come formulazioni spot-on per la protezione dei singoli cani e sono anche comunemente usati per la prevenzione della LCan in Europa. Le formulazioni spot-on a base di permetrina/imidacloprid forniscono attività repellente contro i flebotomi per un massimo di tre settimane, e i prodotti possono essere riapplicati ogni tre settimane per tutto il tempo necessario (Miro et al., 2007). Le formulazioni spot-on dovrebbero essere applicate almeno due giorni prima del viaggio per assicurare che gli animali siano protetti prima dell'esposizione. L'uccisione di massa di questi vettori non è considerata una misura di controllo impossibile per i flebotomi, poiché tendono ad abitare aree focali piuttosto che avere una distribuzione diffusa e i siti di riproduzione rimangono sconosciuti (Wylie et al., 2014).

## Collari deltametrina (DEL)

Numerose pubblicazioni hanno dimostrato che il piretroide deltametrina impregnato in un collare di cloruro di polivinile (PVC) e indossato dai cani durante la stagione di esposizione a *L. infantum* riduce l'incidenza di sieroconversione da *Leishmania* in condizioni ambientali naturali.

Alcuni studi in laboratorio hanno dimostrato che l'attività anti-feeding di questo collare (Scalibor® Protector Band) dura tutta la stagione, ma sono necessari studi ben controllati per indagare la durata specifica del periodo in cui il collare impedisce l'alimentazione del flebotomo (Paulin et al., 2018).

La deltametrina viene rilasciata progressivamente come risultato dell'attrito tra il collare e il pelo; in effetti, il contatto rilascia l'insetticida gradualmente dalla matrice plastica di cui è fatto il collare. Il principio attivo penetra nel tessuto cellulare sottocutaneo e si distribuisce nel grasso, coprendo l'intera superficie dell'animale in una o due settimane, anche se c'è una maggiore concentrazione del prodotto in prossimità del collo e della testa (Alvar et al., 2004).

Gli studi condotti sono stati progettati con l'obiettivo di determinare l'efficacia anti-feeding e insetticida/abbattente (fornita da una singola applicazione della deltametrina nei cani) contro *L. infantum* (Paulin et al., 2018).

In una regione costiera dell'Italia nord-occidentale (Liguria), solo tre dei 119 (2,5%) cani con collare sono andati incontro a sieroconversione, sulla base di un test di immunofluorescenza per la rilevazione di anticorpi contro la *Leishmania*, rispetto al 15% dei cani di controllo non trattati (Ferroglio et al., 2008).

In Italia meridionale (Campania) sono stati stimati i tassi di protezione anti-*Leishmania* forniti dal collare, rispetto ai cani di controllo non trattati, al 72,3 e 41,2% nel 2003 e 2004, rispettivamente. Nei cani sieroconvertiti in questo studio, i segni clinici della leishmaniosi canina erano significativamente più frequenti e rapidamente progressivi nei cani controllo rispetto ai cani con collare (Foglia et al., 2006).

La deltametrina, come la maggior parte dei piretroidi, fornisce un effetto di repellenza spaziale e/o di irritazione da contatto per gli insetti.

L'applicazione del collare di deltametrina ai cani una volta all'anno riduce il rischio di infezione da *Leishmania*, allevia la pressione sui proprietari dei cani per la conformità a uno schema di trattamento ripetuto ed evita la necessità di definire l'inizio e la fine della stagione del flebotomo. Nei cani che ricevono il collare di deltametrina a lento rilascio, l'efficacia anti-feeding si dimostra significativamente maggiore tra il giorno 7 e il giorno 196, anche se questo effetto risulta essere inferiore al 50% a partire dal giorno 56 per tutta la durata dello studio. In questo modo, un collare applicato a un cane per un anno può prevenire o ridurre la trasmissione del flebotomo in quest'arco di tempo (Paulin et al., 2018).

## Collari flumetrina/imidacloprid (FLU/IMI)

L'efficacia di un collare insetticida e repellente a lento rilascio contenente il 10% di imidacloprid e il 4,5% di flumetrina (Seresto, Bayer Animal Health) nella prevenzione dell'infezione da *L. infantum* è stata valutata in una vasta popolazione di cani che vivono in una zona iper-endemica.

In uno studio condotto a partire da marzo 2012, i cani sono stati portati in due rifugi per animali privati in Sicilia, a Messina e ad Augusta, entrambi situati in una zona iper-endemica per *L. infantum*.

Il giorno dell'inclusione (D0) i collari impregnati di imidacloprid 10% + flumetrina 4,5% sono stati applicati ai cani trattati sulla base del loro peso corporeo, mentre i restanti cani non sono stati trattati e sono serviti come controlli negativi.

Poiché l'obiettivo dello studio era definire l'efficacia del trattamento nella prevenzione dall'infezione da *L. infantum*, i cani negativi sono stati definiti come quelli risultati negativi in uno qualsiasi dei test diagnostici per tutta la durata dello studio. La valutazione dell'efficacia si è basata sul confronto dell'incidenza di cani infettati da *L. infantum* nei due gruppi di trattamento.

L'incidenza è stata calcolata come l'incidenza media annuale (cioè considerando solo i risultati del campionamento finale senza tener conto di ciò che è successo in itinere) come segue:

$$\text{incidenza media annuale} = \frac{\text{numero di cani appena infettati da } L. \text{ infantum}}{\text{numero di cani negativi arruolati all'inizio} - \text{numero di cani persi o morti}} \times 100$$

L'efficacia (%) del collare nel prevenire l'infezione da *L. infantum* è stata calcolata utilizzando la formula:

$$\% \text{efficacia} = \frac{\% \text{ di cani positivi nel gruppo G2} - \% \text{ di cani positivi in G1}}{\% \text{ di cani positivi in G1}} \times 100$$

I cani sono stati campionati in serie il giorno 90, 180, 210 e 300 per valutare l'infezione da *Leishmania* mediante IFAT, PCR su pelle (D210-D300) e midollo osseo (D300) e citologia su aspirato midollare (D300).

Tre cani trattati (2,9%) e 41 cani di controllo (40,2%) sono diventati positivi per *L. infantum* in almeno uno dei test diagnostici impiegati nello studio. Anche se sieropositivi, questi animali non hanno mostrato segni clinici suggestivi di LCan.

Il numero di cani sieropositivi usati come controllo è aumentato nel corso dello studio da 15 (D90) a 41 (D300), con alcuni di loro positivi anche ad altri test diagnostici. Otto (19,6%) dei cani sieropositivi del controllo hanno mostrato un aumento dei titoli anticorpali da 1:160 a 1.280. All'ultimo follow-up, alcuni dei cani non trattati hanno mostrato segni clinici evidenti suggestivi di leishmaniosi, come l'ingrossamento dei linfonodi (68,3%), la dermatite esfoliativa secca (14,6%) e la perdita di peso (2,4%).

Il tasso medio di densità di incidenza al follow-up finale era del 4,0% per i cani trattati e del 60,7% per i cani non trattati, portando a un'efficacia media del collare nel proteggere i cani in entrambi i siti del 93,4%. La protezione conferita da un singolo collare (fino a otto mesi) ha coperto un'intera stagione del flebotomo in un'area iper-endemica dell'Italia meridionale. L'uso regolare di collari a lento rilascio, almeno durante la stagione a rischio, può rappresentare una strategia sicura ed efficace per la prevenzione della leishmaniosi nei cani che vivono in un'area endemica o in viaggio verso di essa.

I flebotomi (n = 700) sono stati catturati dalla fine di maggio 2012 fino alla prima settimana di novembre 2012 e dalla fine di giugno a ottobre.

Il maggior numero (n = 327) di flebotomi è stato catturato in settembre, mentre la maggior parte degli esemplari di *P. perniciosus* sono stati raccolti in agosto (n = 21), settembre (n = 40) e ottobre (n = 25).

L'iperendemicità di entrambi i siti di studio è stata confermata dall'incidenza annuale (39,4%). Questo potrebbe essere dovuto alla presenza simultanea di animali malati e di cani suscettibili e non protetti nei due rifugi, insieme alla presenza di specie di flebotomi competenti.

Inoltre, secondo i risultati dello screening preliminare, un gran numero di cani apparentemente sani ma sieropositivi erano presenti in entrambi i siti di studio (S1 = 14,6%; 21/ 144 e S2 = 25,4%; 79/311).

Nel corso dello studio, un totale di 47 (40,2%) su dei 117 cani senza collare sono risultati positivi almeno in una delle quattro indagini di follow-up.

Il meccanismo attraverso il quale il collare protegge i cani contro i flebotomi è l'effetto anti-feeding della flumetrina che riduce il numero di punture dei flebotomi e, a sua volta, l'infezione. Allo stesso modo, è stato dimostrato che un piccolo numero di flebotomi può effettivamente nutrirsi sui cani con collare. Tuttavia, la maggior parte dei flebotomi nutriti su cani con collare morirà in poche ore e difficilmente contribuirà alla trasmissione dell'infezione ad altri cani (Brianti et al., 2014).

Un altro studio è stato condotto da marzo 2011 a ottobre 2012 in un rifugio privato per animali a Putignano, in Puglia.

Nei tre anni precedenti lo studio, era stata monitorata l'incidenza annuale di flebotomi presenti nella zona, che era pari al 47,6% (area iper-endemica dell'Italia meridionale).

Lo studio è stato condotto su 124 cani giovani, di cui 63 sono stati sottoposti a collare (Gruppo A) mentre 61 sono stati lasciati non trattati (Gruppo B), da marzo-aprile 2011 a marzo 2012. I campioni di sangue e di pelle sono stati raccolti al giorno 0 (aprile 2011), al primo, secondo, terzo e quarto punto di follow-up (luglio, settembre e novembre 2011 e marzo 2012, rispettivamente).

Alla fine della sperimentazione, nessun cane del gruppo A è risultato positivo a *L. infantum* a qualsiasi controllo, mentre 22 cani del gruppo B erano stati infettati (tasso di incidenza = 45,1%); pertanto, la combinazione del 10% di imidacloprid e del 4,5% di flumetrina era efficace al 100% per la prevenzione dell'infezione da *L. infantum* nei cani giovani prima della loro prima esposizione al parassita in un'area iper-endemica per la CanL.

Nel marzo 2012, alla fine del periodo di trattamento, i cani del gruppo A e B che non sono stati adottati da privati cittadini sono rimasti non trattati fino a ottobre 2012, facilitando così l'esposizione a *L. infantum* per tutta la stagione successiva del flebotomo. Nell'ottobre 2012, è stata eseguita una raccolta completa di campioni sui restanti 111 animali (62 dal gruppo A e 49 dal gruppo B, rispettivamente). Questo test di follow-up, compreso il test sierologico, citologico e PCR, è stato eseguito sette mesi dopo la rimozione dei collari (marzo 2012) per

determinare l'incidenza della LCan tra i cani con o senza collare nel corso dell'anno precedente, e lasciati non trattati per tutta la seguente stagione del flebotomo (maggio-ottobre 2012).

Dei 176 giovani cani arruolati nello studio, 52 (29,5%) sono morti entro le prime sei settimane, quindi sono stati scartati dallo studio.

Nessun cane del gruppo A è diventato positivo per *L. infantum* portando ad un'efficacia finale del 100% negli animali con collare, mentre l'infezione da *Leishmania*, dedotta dalla positività in almeno uno dei tre test eseguiti (cioè, sierologia, citologia e PCR) al primo, secondo, terzo e ultimo punto di follow-up è stata diagnosticata in 21 (IDR = 45,1%) cani del gruppo B.

Dei 51 cani del gruppo B al follow-up finale, 18 erano positivi a *L. infantum*, portando così a un'incidenza del 35,3% in un anno.

Dopo la fine del periodo di trattamento (marzo 2012), 111 animali (62 del gruppo A e 49 del gruppo B) sono rimasti non trattati per tutta la stagione successiva del flebotomo. Nell'ottobre 2012, nel gruppo A 8/62 (12,9%) e nel gruppo B 29/49 (59,2%) sono risultati positivi a *L. infantum*, portando a un'incidenza complessiva nel 2012 del 20,6% (19 nuovi casi su 92 cani negativi a marzo 2012), sette mesi dopo la rimozione dei collari.

In entrambi gli anni i flebotomi sono apparsi per la prima volta durante l'ultima settimana di maggio, quando la temperatura è aumentata e l'umidità è diminuita con la maggior parte dei campioni di flebotomi raccolti a luglio.

In entrambi gli anni, *Sergentomya minuta* (66,6%) è stata la specie più frequentemente identificata, seguita da *Phlebotomus perniciosus* (15,1%), *Phlebotomus neglectus* (8,8%) e *Phlebotomus papatasi* (0,23%).

Il tempo di utilizzo di un singolo collare variava da un minimo di tre mesi fino a un massimo di otto mesi. Di conseguenza, nell'87,3% (n= 55) degli animali con collare l'efficacia protettiva del collare contro *L. infantum* è stata studiata per un periodo di 6-8 mesi. Sulla base delle attuali conoscenze delle dinamiche stagionali del flebotomo, la durata della protezione conferita da un singolo collare copre un'intera stagione del flebotomo nell'Italia meridionale. L'efficacia prolungata della combinazione imidacloprid al 10% e flumetrina al 4,5% è molto probabilmente legata al fatto che la matrice del collare permette un rilascio uniforme dei principi attivi a una concentrazione costante, a differenza dei collari registrati con deltametrina.

Mentre l'attività del flebotomo nell'Europa meridionale raggiunge il suo picco durante l'estate (cioè giugno, luglio e agosto), il rischio di punture di *Leishmania* si estende dalla tarda primavera all'autunno, che coincide con il picco del turismo in queste zone, massimizzando così il rischio di acquisire leishmaniosi canina e umana, con la conseguente introduzione di cani infetti in aree non endemiche. Pertanto, la protezione delle popolazioni canine che possono agire come un importante serbatoio dell'infezione da *L. infantum* è fondamentale (almeno) tra maggio e ottobre.

L'uso diffuso di questa efficace misura profilattica, combinata con ulteriori strategie di controllo dirette verso la riduzione dell'infezione da *L. infantum* contribuirà in ultima analisi

l'eliminazione dei rischi per le popolazioni canine e umane allo stesso modo. Un approccio "One Health" al controllo della leishmaniosi è assolutamente necessario (Otranto et al., 2013).

## Confronto tra collare DEL e collare FLU/IMI

Un altro studio ha esaminato l'efficacia di due collari per il trattamento e la prevenzione delle dell'infezione da *Leishmania infantum*

224 cani provenienti da rifugi per animali privati in Sicilia (Catania e Siracusa) sono stati arruolati in aprile/maggio e sono stati suddivisi in quattro gruppi:

- G1 (55 cani) trattati con collare al 10%imidacloprid + 4,5% flumetrina (Seresto, Bayer Animal Health);
- G2 (60 cani) trattati con collare al 4%deltametrina (Scalibor protector band, MSD Animal Health);
- G3 (54 cani) vaccinati con CaniLeish (Virbac Animal Health);
- G4 (55 cani) non trattati come controlli.

I cani sono stati seguiti al giorno 120 (settembre), 210 (dicembre) e 360 (aprile-maggio). L'efficacia

di Seresto nel proteggere i cani dall'infestazione era del 100% ( $P < 0,01$ ) al giorno 120 e 210, mentre gli animali trattati con Scalibor hanno mostrato una prevalenza dell'infestazione dal 23,3% al 33,3% rispettivamente al giorno 120 e 210.

Alla fine dello studio, l'incidenza dell'infezione da *L. infantum* nei cani con collare, basata su animali positivi a qualsiasi test, era 5,5% nei cani trattati con Seresto e 20% nei cani trattati con Scalibor, con conseguente efficacia complessiva di prevenzione dell'88,3% per Seresto e del 61,8% per Scalibor. Non è stata rilevata alcuna differenza statistica nei cani positivi a *L. infantum* per la PCR del midollo osseo e/o la citologia al giorno 360 tra il CaniLeish (15,4%) e i cani di controllo non trattati (10,0%). Entrambi i collari si sono dimostrati efficaci ( $P < 0,01$ ) nel prevenire l'infezione da *L. infantum* durante una stagione di trasmissione, mentre nessuna differenza significativa è stata registrata nella frequenza delle infezioni attive tra i cani vaccinati con CaniLeish e i cani di controllo, sottolineando l'importanza di usare repellenti/insetticidi attivi come misura prioritaria per la protezione contro la leishmaniosi canina.

Nessuna anomalia è stata osservata nei cani con collare nei sette mesi di applicazione dei collari o come conseguenza della vaccinazione, tranne tre cani nel gruppo trattato con Scalibor che mostravano lesioni cutanee al collo, apparse da due a cinque mesi dopo l'applicazione del collare, probabilmente dovuto allo sfregamento meccanico della zona con il collare. Tutte le lesioni sono state recuperate da 3 a 25 giorni dopo un ulteriore allentamento dello Scalibor senza alcun trattamento o dopo un trattamento topico con crema antibiotica o schiuma antibatterica. Cinque cani (uno del gruppo Seresto e quattro del gruppo di controllo) erano affetti da rogna demodettica e un cane del gruppo di controllo era affetto da rogna sarcoptica.

Tutti i prodotti si sono dimostrati sicuri e il loro uso dovrebbe essere considerato quando si pianificano strategie di controllo contro il CanL. Tuttavia, a causa della sua inefficacia nella

prevenzione dell'infezione da *L. infantum* e secondo le prescrizioni, il vaccino è sempre raccomandato in combinazione con repellenti/insetticidi e non può sostituire il loro uso nelle aree endemiche di CanL (Brianti et al., 2016).

## Spot-on

Oltre ai collari, sono state sviluppate altre formulazioni per prevenire la diffusione di *L. infantum*: spot-on. Gli spot-on si trovano in commercio sotto forma di pipette che contengono una soluzione topica incolore o giallastra o brunastra pronta all'uso. L'ingrediente attivo comune a tutte le pipette disponibili in commercio è la permetrina (PER, Figura 19), un piretroide sintetico di tipo I noto per prevenire le punture dei flebotomi nei cani.

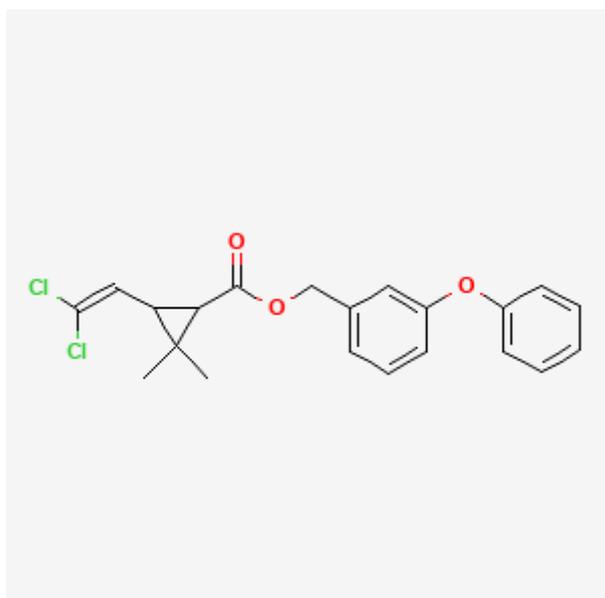


Figura 19. Formula chimica della permetrina. È un piretroide di tipo 1, ovvero caratterizzato dalla presenza di una molecola alcolica che attribuisce fotostabilità alla molecola, aumentandone la permanenza ambientale (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/135003399#section=Identity>, data 07/02/2022).

L'attività protettiva di PER dura da 2 a 4 settimane.

Gli spot-on mostrano effetti di breve durata e si diffondono rapidamente sulla superficie del corpo del cane attraverso il pelo degli animali trattati. Poiché l'inizio dell'azione è di solito 24-48 ore dopo l'applicazione, questo deve essere preso in considerazione prima dell'esposizione per assicurare che gli animali siano adeguatamente protetti (Galvez et al., 2018).

Gli spot-on che vengono utilizzati maggiormente nel cane in Europa sono a base di:

- Permetrina 50%-imidacloprid 10% (PER/IMI)
- Permetrina 65% (PER)
- Permetrina 50,48%-fipronil 6,76% (PER/FIP1)
- Permetrina-dinotefuran-piriproxifen (PER/DIN/PYR)

(Vulpiani et al., 2011).

È fondamentale tenere presente che le formulazioni spot-on dovrebbero essere applicate almeno due giorni prima del viaggio per assicurare che gli animali siano protetti prima

dell'esposizione. L'uccisione di massa dei vettori, effettuata per alcune malattie nate da vettori, non è considerata una misura di controllo appropriata, poiché i flebotomi tendono ad abitare aree focali piuttosto che avere una distribuzione diffusa e i siti di riproduzione rimangono sconosciuti (Wylie et al., 2014).

L'applicazione di queste misure preventive è essenziale non solo per i cani locali che vivono nelle aree endemiche, ma anche per quelli provenienti da regioni non endemiche, al fine di ridurre il rischio di trasmissione e diffusione della malattia (Papadopoulos et al., 2017).

### Spot-on ExSpot

Exspot è disponibile in un unico tipo in confezione da 6 pipette il cui contenuto va applicato a diretto contatto con la cute. Nei cani di peso inferiore o uguale a 15 kg si utilizza una pipetta il cui contenuto va interamente applicato tra le scapole dell'animale; in cani che pesano più di 15 kg, si utilizzano invece 2 pipette, applicando la prima tra le scapole e la seconda sul dorso, alla base della coda. La ditta consiglia un'applicazione ogni 4 settimane (3 settimane se le condizioni ambientali lo richiedono). Per entrambi i prodotti è consigliabile attendere almeno 2 giorni dopo l'applicazione del prodotto prima di lavare l'animale (<https://www.prontuarioveterinario.it/>).

È stato progettato e portato a termine uno studio per andare a valutare gli effetti repellenti e insetticidi a breve termine di permetrina 65% (ExSpot) applicata topicamente a cani sani come spot-on contro *Phlebotomus perniciosus*, per determinare la durata di questi effetti e per stabilire un dosaggio efficace.

La durata degli effetti indesiderati è stata stimata anche per progettare un trattamento ottimale e sicuro, non solo per i cani sani, ma anche per i portatori di *Leishmania* che possono essere infettivi.

La popolazione iniziale dello studio comprendeva 15 beagle, sette maschi e otto femmine, di peso compreso tra 9,3-16,3 kg.

I cani nel gruppo di trattamento (n = 6) hanno ricevuto il giorno 0 una singola dose di un insetticida topico spot-on per cani costituito da 65% permetrina in glicole propilenico monomethyl (ExSpot®, Schering Plough, SA). I cani di controllo (n = 6), invece, non hanno ricevuto alcun trattamento.

I valori di efficacia sono stati calcolati per ogni giorno di test come le percentuali di alimentazione e mortalità registrate nei gruppi di trattamento (T) e nei gruppi di controllo (C), utilizzando le equazioni di seguito.

L'efficacia repellente (Figura 20) è stata espressa in termini di riduzione dell'alimentazione (NFR) come:

$$\frac{\text{Flebotomi alimentati (vivi e morti) in C} - \text{Flebotomi alimentati (vivi e morti) in T}}{\text{Flebotomi alimentati (vivi e morti) in C}} \times 100$$

L'effetto repellente della permetrina 65% gradualmente diminuisce e si presenta ancora accertabile il giorno 22. Il giorno 36 viene evidenziata una significativa differenza tra i due gruppi ( $p = 0.000$ ) e il giorno 43 una perdita di significatività ( $p = 0.400$ ).

I cani erano efficacemente protetti contro le punture di *P. perniciosus* per un periodo di 22 giorni a partire da 24 ore dopo l'applicazione.

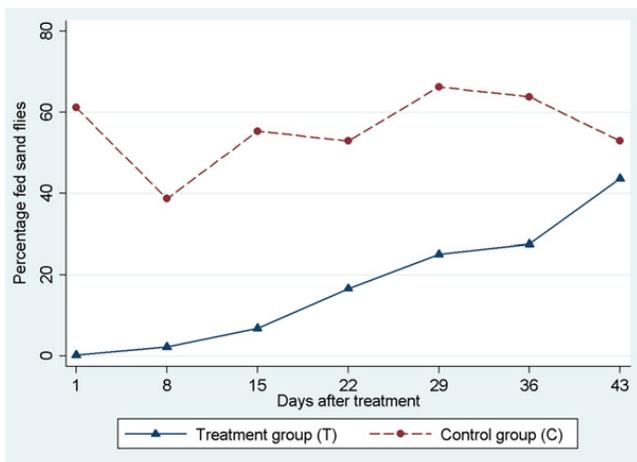


Figura 20. Effetto repellente dello spot-on al 65% di permetrina applicato sui cani contro *Phlebotomus perniciosus* dal giorno dopo il trattamento (giorno 1) al giorno 43 (Molina et al., 2012).

L'efficacia insetticida (Figura 21) è stata espressa in termini di aumento della mortalità (NMI) come:

$$\frac{\text{Flebotomi vivi (nutriti e non nutriti) in C} - \text{Flebotomi vivi (alimentati e non alimentati) in T}}{\text{Flebotomi vivi (alimentati e non alimentati) in C}} \times 100$$

L'efficacia insetticida a breve termine della formulazione è durata fino al giorno 36 ( $p = 0.013$ ) con una differenza significativa tra il gruppo di trattamento e quello di controllo nel corso del tempo e una mancanza di significatività registrata il giorno 43 ( $p = 0,086$ ).

Le proprietà insetticide erano alte dopo il trattamento (97,6 e 79,7% nei giorni 1 e 8, rispettivamente) ma sono rapidamente scese a 43,2% quindici giorni dopo il trattamento. Le differenze con il gruppo di controllo erano comunque significative fino al giorno 36.

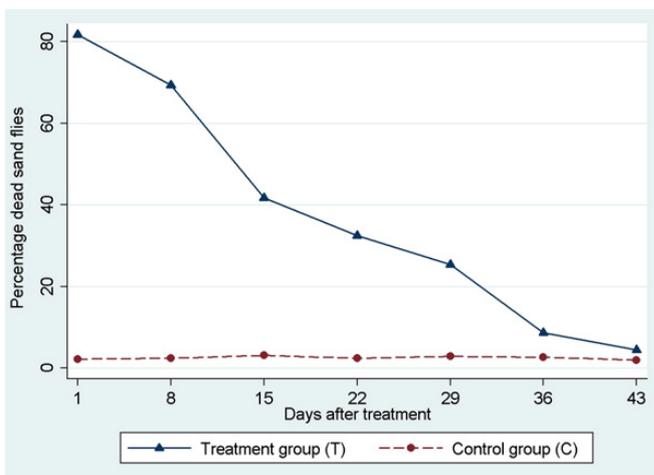


Figura 21. Effetto insetticida dello spot-on al 65% di permetrina applicato sui cani contro *Phlebotomus perniciosus* dal giorno dopo il trattamento (giorno 1) fino al giorno 43 (Molina et al., 2012).

Non sono stati osservati eventi avversi gravi legati al trattamento osservati durante il periodo di studio (Molina et al., 2012).

La persistenza dell'efficacia non è sempre la caratteristica più richiesta; strategie in grado di proteggere cani immediatamente sono necessarie in situazioni come viaggi imminenti in zone rurali o in aree endemiche note. In questi casi, i collari alla deltametrina dovrebbero essere evitati perché saranno completamente efficaci solo due settimane dopo la loro applicazione (Apostolopoulos et al., 2018).

Possiamo affermare che la permetrina 65% applicata come spot-on esercita un forte effetto repellente e un moderato effetto insetticida contro *P. perniciosus*. I cani in aree endemiche dovrebbero essere trattati con questa formulazione a intervalli di 2-3 settimane per assicurare una protezione efficace contro infezione da CanL. L'uso di formulazioni come la permetrina (spot-on) al 65%, oltre a fornire una protezione individuale, può anche ridurre le popolazioni di flebotomi e la prevalenza di CanL (Molina et al., 2012, Galvez et al., 2018).

### Spot-on Vectra®

Vectra 3D è un medicinale veterinario usato nei cani per il trattamento e la prevenzione di infestazioni da pulci e zecche e per l'attività repellente di flebotomi, zanzare e mosche. Vectra 3D contiene tre principi attivi: dinotefuran, piriproxifene e permetrina.

I principi attivi di Vectra 3D agiscono come "ectoparassitocidi", ossia eliminano i parassiti che vengono a contatto con la cute o il pelo degli animali, come pulci, zecche e flebotomi.

Dinotefuran e permetrina sono insetticidi che uccidono gli insetti agendo sul loro sistema nervoso con meccanismi diversi:

- permetrina esercita un'azione analoga anche sulle zecche e interferisce con i canali del sodio prolungando la trasmissione degli impulsi nervosi.
- dinotefuran agisce sui recettori nicotinici dell'acetilcolina

Quando sono somministrati insieme, i due principi attivi rafforzano le rispettive azioni. Piriproxifene è un regolatore della crescita degli insetti che interrompe il ciclo di vita delle pulci determinando la produzione di uova non fertili e bloccando lo sviluppo delle pulci dagli stadi giovanili a quelli adulti.

Gli effetti collaterali più comuni di Vectra 3D (che possono riguardare fino a 1 cane su 1000) sono arrossamento, prurito o altri segni di breve durata in corrispondenza del sito di applicazione. Solitamente scompaiono entro 24 ore dopo la somministrazione. Altri effetti collaterali di Vectra 3D (che possono riguardare fino a 1 cane su 1000) sono disturbi comportamentali quali iperattività, abbaio o ansia, letargia (mancanza di energia) o anoressia (perdita dell'appetito) nonché segni a carico del sistema nervoso come i tremori muscolari. Vectra 3D non deve essere utilizzato nei gatti. Inoltre, occorre evitare che i gatti si strofinino su cani recentemente trattati con il medicinale, poiché tale contatto può provocare effetti nocivi potenzialmente letali

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/vectra-3d-epar-medicine-overview\\_it.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/vectra-3d-epar-medicine-overview_it.pdf)).

È stato condotto uno studio presso il Centro Regionale per il monitoraggio delle malattie parassitarie (CREMOPAR), Eboli (SA) in Italia per valutare gli effetti e l'efficacia della soluzione spot-on di dinotefuran, piriproxifen e permetrina (Vectra®3D, Ceva Santé Animale, Libourne, Francia) su cani infetti tramite *P. perniciosus*.

Dopo essere stati applicati sulla pelle del cane, i principi attivi si diffondono su tutta la superficie del corpo e sul pelo. Anche se scoraggiato dai produttori e dalle autorità di regolamentazione, una combinazione di dispositivi è comunemente usata dai proprietari di cani, essendo molto impiegata l'associazione collare e spot-on (Zini et al., 2020).

Già il giorno 1, l'efficacia si è dimostrata essere:

- efficacia anti feeding >95% in 4 cani
- efficacia insetticida 100% in 4 cani
- effetto anti trasmissibilità 100% in 6 cani.

I tassi di efficacia erano pressoché simili anche il giorno 7. Mentre il giorno 28 i valori risultavano essere più variabili:

- efficacia anti alimentazione 32,6-100%
- efficacia insetticida 7,7-94,4%

Dallo studio si evince che gli effetti repellenti e insetticidi sui flebotomi sono dovuti alla combinazione di attività della permetrina, un eccito-repellente, insetticida moderato e piretroide, e dinotefuran, un insetticida neonicotinoide. Il dinotefuran ha dimostrato di essere altamente tossico per i flebotomi. Inoltre, è stata dimostrata un'attività sinergica tra i due principi attivi contro gli insetti e ci si aspetta che forniscano un'efficacia migliore.

L'attività anti-trasmissibilità registrata da Vectra®3D nei cani malati era probabilmente dovuta a entrambi gli effetti, che erano diversamente espressi tra i cani al giorno 28. In cani già infetti, il primo beneficio atteso del prodotto è quello di evitare la diffusione del patogeno dall'ospite serbatoio. Il prodotto impedirà anche le punture da flebotomi potenzialmente infettivi, limitando, in questi animali che sono già indeboliti, la nuova sfida da *Leishmania* in questi animali, che sono già indeboliti, o da altre malattie trasmesse da vettori che potrebbero peggiorare il quadro clinico.

Tra gli insetticidi topici canini disponibili con provata efficacia contro *Leishmania*, la scelta di una formulazione spot-on vs. collari impregnati di deltametrina a lunga durata per il controllo della leishmaniosi dovrebbe essere basata su una serie criteri:

- un più ampio spettro di attività contro gli artropodi vettori,
- evitare la brusca perdita di protezione soprattutto nei cani che vivono in gruppo (ad es. perdita del collare),
- un rapido inizio d'azione raggiunto da Vectra®3D entro le prime 24 ore dall'applicazione, mentre i collari richiedono diversi giorni prima che i livelli appropriati di piretroide si diffondano sul corpo del cane.

In conclusione, il trattamento topico mensile con Vectra®3D della popolazione canina in aree endemiche di *L. infantum*, compresi animali sani e infetti, rappresenta uno strumento affidabile per il controllo della malattia zoonotica. Complessivamente, lo spot-on testato ha limitato in un mese di oltre il >98% la trasmissibilità di *Leishmania* dal gruppo esaminato di cani infetti (Bongiorno et al., 2021).

### Spot-on Frontline Tri-Act®

Questa formulazione spot-on è costituita da fipronil e permetrina.

È stato condotto uno studio per valutare l'efficacia della formulazione spot-on Frontline Tri-Act, confrontata con l'uso del collare a base di deltametrina Scalibor (descritto precedentemente), entrambi utilizzati per prevenire l'infezione da *L. infantum*. Lo studio è durato 5 mesi ed è stato condotto in Grecia poiché le aree del bacino del Mediterraneo sono altamente endemiche (la sieroprevalenza media è stimata essere il 22% nei cani (Ntais et al., 2013)) ed è durato 5 mesi.

25 cani sono stati trattati con collare di deltametrina (Scalibor®) (Gruppo 1) e 31 sono stati trattati mensilmente con la formulazione topica di fipronil/permetrina (Gruppo 2). Nel gruppo 1, tre cani su 25 (12%) risultavano sieropositivi per *Leishmania*, mentre nel gruppo 2 nessuno dei cani (0/31) si era convertito.

Questo studio, condotto in un'area altamente endemica per la trasmissione di patogeni trasmessi da vettori, ha confermato che l'uso di deltametrina e permetrina è un approccio adeguato a ridurre il rischio di *L. infantum* da parte dei flebotomi.

La permetrina/fipronil in una formulazione spot-on (Frontline Tri-Act®) ha dimostrato sia attività repellente sia velocità sostenuta di uccisione di pulci e zecche, così come l'attività repellente e insetticida contro le zanzare, flebotomi e mosche. Si è quindi ipotizzato che un uso mensile fornirebbe protezione contro la trasmissione di alcuni agenti trasmessi da vettori canini (Papadopoulos et al., 2017).

L'uso di molecole repellenti come i piretroidi sintetici sui cani è diventato lo strumento più efficace per la prevenzione dell'infezione da *L. infantum* in questi animali. Il loro meccanismo d'azione, sia irritante che neurotossico, provoca il disorientamento degli artropodi e l'abbandono improvviso dell'ospite, che può essere seguito dalla morte del vettore se il contatto con il pelo dell'animale trattato è stato sufficiente per ottenere una dose letale. L'effetto dei piretroidi sintetici in formulazioni spot-on o collari può durare da 2 a 3 settimane a circa 8 mesi a seconda delle formulazioni, i principi attivi e i parassiti mirati (Beugnet et Franc, 2012). Nel caso della deltametrina presente nel collare, l'effetto repellente è indicato per cinque mesi contro i flebotomi. Per quanto riguarda la formulazione topica di fipronil/permetrina (Frontline Tri-Act®/Frontect®), studi sperimentali hanno dimostrato un effetto repellente (misurato come effetto anti-feeding dopo 1 ora di esposizione) contro i flebotomi dell'80% per 4 a 5 settimane (Dumont et al., 2015).

Di solito ci vogliono circa 24 ore perché il principio attivo (o i principi attivi) si diffonda in tutta la cute dopo un'applicazione spot-on o di collare. Al fine di ottenere il massimo livello di protezione, si raccomanda di somministrare il primo trattamento prima che inizi la stagione dei flebotomi, delle zanzare e/o delle zecche (Dantas-Torres e Otranto, 2016). Il punto chiave per mantenere l'efficacia dell'ectoparassitida è applicare la formulazione spot-on ogni 4 settimane o evitare la perdita del collare (Papadopoulos et al., 2017).

### Spot-on Advantix

Advantix è disponibile in confezioni (diverse a seconda del peso del cane) da 4 pipette. Ad ogni applicazione una pipetta va svuotata sulla pelle del cane, suddividendo il contenuto a partire dalle scapole, fino alla base della coda, in modo che la soluzione rimanga tutta sulla pelle dell'animale e non coli sul pelo, altrimenti il prodotto risulterebbe inefficace. Il prodotto va riapplicato ad intervalli di 3 settimane. Per cani che pesano più di 40 kg, va utilizzata un'idonea combinazione di pipette in base al peso del cane (Figura 22).

Ciascuna pipetta contiene:

	<b>Pipetta</b>	<b>Imidacloprid</b>	<b>Permetrina</b>	<b>Butilidrossi toluene (E321)</b>
Advantix® Spot-on per cani ≤ 4 kg	0,4 ml	40 mg	200 mg	0,4 mg
Advantix® Spot-on per cani > 4 ≤ 10 kg	1,0 ml	100 mg	500 mg	1,0 mg
Advantix® Spot-on per cani > 10 ≤ 25 kg	2,5 ml	250 mg	1250 mg	2,5 mg
Advantix® Spot-on per cani > 25 kg ≤ 40 kg	4,0 ml	400 mg	2000 mg	4,0 mg
Advantix® Spot-on per cani > 40 kg ≤ 60 kg	6,0 ml	600 mg	3000 mg	6,0 mg

Per cani > 60 kg deve essere utilizzata la combinazione appropriata con le pipette delle altre taglie.

Figura 22. Composizione delle pipette spot-on Advantix a seconda del peso del cane. (Foglietto illustrativo di Advantix, Elanco)

L'imidacloprid funge da ectoparassitida attivo nei confronti delle pulci adulte e degli stadi larvali delle pulci. Le pulci adulte vengono uccise rapidamente prima che possano pungere, quelle già presenti sul cane sono uccise entro un giorno dal trattamento. È stata dimostrata anche un'azione larvicida nell'ambiente circostante dopo l'applicazione sull'animale.

La permetrina appartiene alla classe dei piretroidi e agisce anche come repellente. La permetrina contenuta in Advantix possiede un'attività acaricida e repellente verso parassiti come zecche, zanzare e pappataci (o flebotomi) impedendogli di pungere e riducendo così il rischio di trasmissione di malattie trasmesse da questi parassiti come la leishmaniosi. Advantix repelle le zecche prima che possano pungere e uccide quelle venute a contatto con la cute riducendo il rischio di trasmissione anche di Ehrlichiosi, Borreliosi e Rickettiosi veicolate dal morso di zecca. Fornisce attività repellente nei confronti della mosca cavallina aiutando nella prevenzione della dermatite da puntura di mosca (<https://mypetandme.elanco.com/prodotti-antiparassitari/advantix-per-cani/>).

Un altro studio è stato condotto per dimostrare l'efficacia di un altro prodotto, in questo caso la formulazione spot-on Advantix a base di permetrina 50% e imidacloprid 10%.

Questo studio retrospettivo si riferisce ad un periodo di 4 anni, da gennaio 2004 a dicembre 2007, considerando un gruppo di cani allevati dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" in un rifugio a lungo termine, situato a Teramo (Abruzzo).

Dal 2004 al 2007 sono stati ricoverati in totale 656 cani nel 2004, 630 nel 2005, 592 nel 2006, 564 nel 2007. Non sono stati ammessi nuovi cani dal 2005, a causa della mancanza di spazio. Questa situazione ha reso possibile la creazione di un ideale "sistema chiuso", dove la storia clinica di un numero consistente di soggetti poteva essere seguito durante quattro anni consecutivi. In particolare, i cani sieropositivi potevano essere studiati durante tutto il periodo, tenendo presente che questi animali non vengono solitamente adottati (solo cinque cani leishmaniotici, infatti, hanno trovato un nuovo proprietario).

Dal 2005 al 2007 è stato eseguito un trattamento preventivo applicando una preparazione a base di insetticidi (imidacloprid 10%-permetrina 50%) specificamente registrato per la protezione dei cani contro le punture di flebotomi, in formulazione topica ("spot-on") (Advantix1; Bayer; Germania). Il prodotto è stato applicato ogni 30 giorni da maggio a ottobre. Le dosi, secondo le istruzioni del produttore, erano di 1 ml/10 kg.

Più di 50 cani hanno subito sierconversione (74,6% di tutto il pool), solo 4 soggetti (8%) hanno avuto una ricaduta (due di questi sono sopravvissuti dopo una nuova sieroreversione, uno è sopravvissuto sieropositivo fino alla fine del periodo, uno è deceduto dopo la ricaduta), 40 cani (80%) sono rimasti negativi fino alla fine del periodo, 6 (12%) sono morti dopo sieroreversione. Sui restanti 17 cani (25,4% di tutto il pool) che non hanno risposto al trattamento, 15 (88,2%) sono morti persistendo positivi, 2 (11,8%) sono sopravvissuti persistendo positivi.

In un tale sistema chiuso, nessuna influenza esterna (ad es. arrivo di cani positivi e non trattati) ha potuto influenzare i risultati. Una progressiva riduzione della prevalenza e incidenza della reattività sierologica a *L. infantum* è stata osservata dal 2005 al 2007, a conferma dell'efficacia del trattamento somministrato agli animali. Sono state riportate differenze significative tra l'inizio e la fine del periodo di quattro anni, considerando la sieroprevalenza (casi sieropositivi per anno/popolazione totale) e l'incidenza (nuovi casi per anno/popolazione tempo a rischio). Questi supportano la teoria che i risultati positivi raggiunti non siano stati casuali ma dovuti alle azioni eseguite durante l'intero periodo. In particolare, il trattamento preventivo durante i mesi primaverili-estivi (eseguito dal 2005) è stato seguito da una forte diminuzione dei nuovi casi, come evidenziato dalle significative riduzioni di prevalenza e incidenza dal 2005 al 2006 (Figura 23), che contrasta con quello che era stato osservato in assenza trattamento, dal 2004 al 2005 (Vulpiani et al., 2009).

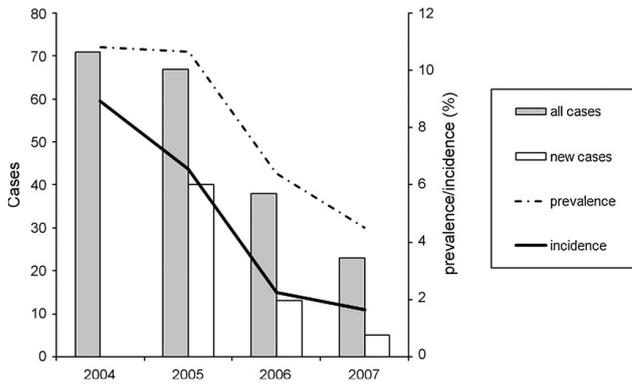


Figura 23. Evoluzione della prevalenza e dell'incidenza della reattività sierologica contro *Leishmania infantum* durante il periodo di quattro anni (Vulpiani et al., 2009).

In sintesi, gli spot-on presenti in commercio mostrano un'efficacia anti-feeding (Figura 24 A) del 90% contro i flebotomi che dura fino a una settimana (PER), due settimane (PER/IND e PER/DIN/PYR), tre settimane (PER/IMI e PER/FIP1). Al contrario, un'efficacia insetticida (Figura 24 B) contro i flebotomi del 90% dura solo un giorno (PER), una settimana (PER/DIN/PYR) o al massimo quattro settimane (PER/FIP1) (Galvez et al., 2018).

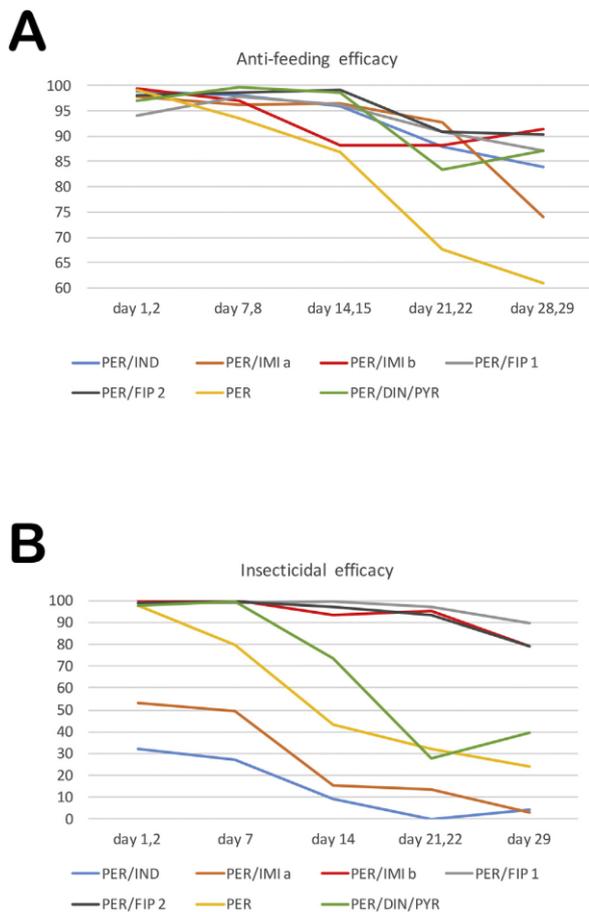


Figura 24. (A) Efficacia anti-feeding (%) e (B) efficacia insetticida (%) delle sei pipette spot-on descritte con provata efficacia repellente e insetticida contro *P. perniciosus*: PER/IND, PER/IMIa, PER/IMI b, PER/FIP 1, PER/FIP 2, PER e PER/DIN/PYR (Galvez et al., 2018).

Negli ultimi anni, molti Paesi hanno dovuto produrre programmi per controllare il serbatoio canino delle leishmanie zoonotiche che hanno a che fare con nuove leggi "no-kill" e una nuova sensibilità "umana" di gran parte della popolazione.

Quindi, metodi diversi dall'abbattimento sistematico dei cani infetti dovevano essere presi in considerazione per controllare questa zoonosi. L'eutanasia degli animali leishmaniotici, ampiamente utilizzata in passato, è ora spesso considerata eticamente inaccettabile (Otranto et al., 2007). In Italia la questione è ancora dibattuta, poiché le leggi non sono chiare su questo problema: alcune autorità italiane considerano la leishmaniosi come una malattia incurabile, e questo giustificerebbe l'impiego dell'eutanasia su cani sieropositivi randagi e in canile. Tuttavia, diversi protocolli terapeutici sono in grado almeno di controllare la malattia, garantendo ai cani un buon livello di benessere; quindi, i cani leishmaniotici non dovrebbero essere uccisi, ma sottoposti a terapie finché il loro livello di sofferenza sia tollerabile. Di conseguenza, l'impiego dell'eutanasia su cani sieropositivi ma non sintomatici, così come l'assenza di terapie, potrebbe essere inteso come maltrattamento secondo la protezione degli animali. L'assenza di trattamento potrebbe anche essere considerata inaccettabile considerando la salute umana: c'è una relazione diretta tra la presenza di casi umani di VL e alti tassi di CanL nei cani. Inoltre, studi epidemiologici hanno riportato prove dell'inefficacia dei programmi di controllo della VL umana che prevedono l'eliminazione dei cani infetti. Pertanto, è necessario considerare approcci alternativi (Alvar et al., 2004).

Le Linee guida dell'Autorità Sanitaria Italiana - Istituto Superiore di Sanità - (Gradoni et al., 2004) hanno affrontato la ZVL (Leishmaniosi viscerale zoonotica) canina con programmi di controllo dei serbatoi canini, sostenendo l'importanza della sorveglianza sierologica attiva e l'utilità di metodi terapeutici completi, che dovrebbero prendere in considerazione sia il trattamento antivettoriale che quello curativo, senza l'impiego dell'eutanasia (Vulpiani et al., 2009).

## Spray

Gli spray vengono applicati direttamente sul pelo in modo che i principi attivi penetrino nella pelle. È importante che questi prodotti siano correttamente applicati su tutta la superficie del corpo per evitare aree del corpo non protette sui cani (Miró et al., 2017). Un prodotto commerciale è disponibile per prevenire l'infezione da *Leishmania* (permetrina/pyriproxyfen 18,8/0,2 mg/ml). L'efficacia anti-feeding di questo spray per *P. perniciosus* si è dimostrata alta nei giorni 7 (91,5%) e 14 (92%), e leggermente diminuita nei giorni 21 (89,3%) e 28 (90,8%), ma ha mostrato comunque una notevole efficacia fino a 4 settimane. La sua attività insetticida, invece, si è dimostrata piuttosto bassa dal momento dell'applicazione al giorno 7 (29,6%) ed era quasi nulla il giorno 28 (0,8%).

Il principale vantaggio di queste preparazioni è l'effetto immediato, e il loro principale svantaggio è la bassa persistenza (Galvez et al., 2018).

Rispetto ai collari e agli spot-on, gli spray risultano immediatamente attivi. L'unico spray disponibile (Duowin, Virbac) ha mostrato un'efficacia repellente del 71,4% ma un effetto

insetticida solo del 7,2%, dopo 21 giorni, presentando pertanto valori più bassi rispetto a collari e spot-on (Vulpiani et al., 2011).

Duowin ha un'efficacia di 2 settimane e va nebulizzato sul mantello del cane, fino ad inumidire completamente il pelo, che va poi massaggiato in modo da favorire la penetrazione del prodotto. Durante l'applicazione, è consigliare indossare dei guanti come misura di protezione personale. Dopo che il pelo si è asciugato, occorre spazzolare il cane. Il numero di vaporizzazioni varia da 2-16 per cani del peso di 1-9 kg, fino a un centinaio nei cani che pesano 60 kg. Se il cane viene lavato, il prodotto va riapplicato subito dopo perché lo shampoo lo asporta completamente (<https://it.virbac.com/prodotti/repellente-flebotomi-duowin>).

Le misure di controllo sono rivolte solo al flebotomo adulto, poiché non è noto con precisione dove si sviluppino le larve e le pupe. La distribuzione di insetticidi nei luoghi dove si sospetta che vivano gli stadi larvali (tane, grotte, buchi, scoli, ecc.) comporta notevoli difficoltà tecniche che precludono l'uso di insetticidi sotto forma di spray. Una spruzzatura bimestrale a bassissimo volume (ULV) di malathion (Insetticida e acaricida, organofosforico) per nove mesi nella foresta di Panama ha ottenuto solo una riduzione transitoria del 30% dei flebotomi nella popolazione quindi si ritiene che l'irrorazione con insetticidi sia utile solo negli ambienti domestici e peridomestici. L'irrorazione dovrebbe essere concentrata sulle pareti interne delle case, sugli stipiti delle porte e sui telai delle finestre, legnaie, cucce e pollai, buchi nei muri, grotte, scatole, tubature e scarichi circostanti, ecc. L'irrorazione interna ha dato buoni risultati quando usata contro i flebotomi endofili in Grecia, India, Israele, Italia ed ex Unione Sovietica. La protezione interna contro il flebotomo può essere ottenuta con reti metalliche o di plastica che proteggono finestre, porte, cucce, ecc., e con tende e reti da letto trattate con piretroidi sintetici residui, specialmente deltametrina e permetrina. Queste misure hanno notevolmente ridotto il tasso medio di puntura in vari paesi interessati dalla Leishmaniosi, come Brasile, Burkina Faso, Italia, Siria, Sudan.

Con la leishmaniosi canina, la comparsa di formulazioni insetticide più efficaci e persistenti ha portato a riconsiderare una strategia anti-vettoriale ben nota nell'allevamento. Questa consiste nel prevenire la puntura del flebotomo applicando direttamente insetticidi sui cani; in tal modo si blocca la trasmissione del parassita all'animale e quindi controlla la malattia (Alvar et al., 2004).

L'uso contemporaneo di più di un metodo di controllo è stato ripetutamente suggerito in passato al fine di rafforzare l'efficacia; in particolare, l'uso di strumenti repellenti può integrare l'uso di trattamenti terapeutici migliorando i loro effetti e, quindi, la loro utilità e accessibilità. Inoltre, l'uso comunitario di strumenti repellenti (spot-on o collari impregnati) potrebbe essere una valida alternativa o supporto ai programmi di controllo basati sull'eutanasia dei cani, per la loro comprovata efficacia e per i costi limitati. La vaccinazione anti-Leishmania è stata utilizzata con successo (Vulpiani et al., 2011).

Uno studio condotto a Madrid, in Spagna, è stato progettato per misurare la prevenzione dell'attacco dei flebotomi spruzzando una combinazione di permetrina e piriproxifene sui cani esposti artificialmente al vettore della leishmaniosi. Otto beagle sono stati esposti individualmente a 100 flebotomi femmina per 1 ora nei giorni -7, 0, 7, 14, 21, e 28. Quattro

cani sono stati assegnati a caso a un gruppo di controllo e quattro cani sono stati trattati con permetrina/pyriproxyfen applicata topicamente il giorno 0. La combinazione di permetrina/pyriproxyfen ha dimostrato un significativo effetto repellente contro le punture di *Phlebotomus perniciosus* non appena è stata spruzzata sui cani, e la sua efficacia repellente è durata almeno per 28 giorni. Il prodotto combinato ha fornito una significativa attività di abbattimento contro i flebotomi per 21 giorni nei cani adulti e 14 giorni nei cuccioli. Questi risultati indicano che gli animali adulti in aree endemiche dovrebbero essere spruzzati con il prodotto permetrina/pyriproxyfen a intervalli di 3 o 4 settimane, e i cani giovani dovrebbero essere spruzzati a intervalli di circa 2 settimane per prevenire l'attacco di *Leishmania* (Mercier et al., 2003).

In un altro studio condotto sempre in Spagna e nelle stesse modalità di prima, si sono ottenuti dei risultati ben precisi:

- l'effetto repellente del trattamento contro le punture dei flebotomi dopo 21 giorni era 71,4%, (99,7%, 89,4% e 46,8% dopo 7, 14 e 28 giorni rispettivamente). L'effetto repellente nei cuccioli è meno significativo. Lo stesso vale anche per l'effetto insetticida.
- l'effetto insetticida, invece, era solo del 29,6%, 32%, 7,2% e 0,8% dopo 7,14,21 e 28 giorni rispettivamente

Il flebotomo grazie alle sue piccole dimensioni riesce a nascondersi bene tra i peli del cane. Ci sono anche delle differenze tra il cucciolo e cane adulto:

- in primo luogo, il mantello di un cane cambia man mano che cresce; il pelo di un adulto differisce notevolmente da quello di un cucciolo. L'attività ciclica del follicolo pilifero di un cucciolo risulta più breve di quella di un adulto e pertanto il principio attivo potrebbe essere eliminato più rapidamente.
- In secondo luogo, la superficie corporea e il peso dei cani non sono direttamente correlati (Molina et al., 2006).

# TERAPIA

Il trattamento della leishmaniosi canina dovrebbe iniziare solo dopo aver stabilito una diagnosi certa (identificando gli amastigoti nella biopsia dal midollo osseo o dal linfonodo) o se c'è una sierologia chiaramente positiva con sintomi clinici compatibili, nonostante non si vedano parassiti nei campioni.

Prima di iniziare il trattamento è consigliabile valutare lo stato del cane (il suo stato generale, temperatura, peso, dimensioni della milza, presenza di sintomatologia, ematochimica, proteine totali e funzioni epatica e renale).

Durante la terapia deve essere effettuato il monitoraggio delle funzioni epatica, cardiaca e renale. La risposta al trattamento è normalmente rapida; in pochi giorni la febbre scompare, il peso aumenta, l'ingrossamento viscerale e le lesioni cutanee si riducono, il quadro ematico torna alla normalità e si verifica un miglioramento generale delle condizioni del cane. Se questo non si verifica,

c'è la possibilità di qualche infezione associata o l'esistenza di un'infezione resistente ai farmaci.

Dopo il trattamento, dovrebbero essere eseguiti, comunque, esami biochimici, clinici e parassitologici.

La risposta clinica attesa al trattamento dei cani malati può variare da scarsa a buona a seconda del loro stato clinico-patologico iniziale. I cani con insufficienza renale dovrebbero avere un tasso di recupero più basso rispetto a quelli senza compromissione renale. La maggior parte dei cani sperimenta un miglioramento clinico entro il primo mese di terapia, anche se, in altri, è necessario un periodo più lungo di terapia prima di qualsiasi miglioramento apparente (Solano-Gallego et al., 2009).

I cani trattati dovrebbero essere valutati periodicamente per individuare eventuali ricadute: di solito è necessario almeno un controllo ogni sei mesi o un anno.

La terapia della leishmaniosi canina viene effettuata con gli stessi farmaci che sono stati usati nell'uomo dalla metà del XX secolo, anche se differiscono per la modalità di somministrazione e il dosaggio.

I farmaci di prima scelta sono gli antimoniali pentavalenti, miltefosina e allopurinolo e le terapie di seconda linea includono amfotericina B, pentamidina, la paromomicina e altri. L'attuale tendenza terapeutica è quella di utilizzare farmaci tradizionali in formulazioni lipidiche, anche se sono state trovate nuove molecole efficaci (Alvar et al., 2004).

Tutti i noti farmaci anti *Leishmania* utilizzati nei cani possono portare a temporanea o permanente remissione dei segni clinici, ma nessuno è sufficiente per eliminare l'infezione.

La maggior parte dei protocolli terapeutici sono stati sviluppati attraverso studi clinici sull'uomo e successivamente adattati ai cani, spesso senza sufficienti informazioni farmacocinetiche rilevanti per i cani. Nei cani, gli obiettivi del trattamento anti-*Leishmania* sono:

- indurre una riduzione generale del carico del parassita;
- trattare i danni agli organi causati dal parassita;

- ripristinare risposte immunitarie efficienti;
- stabilizzare un miglioramento clinico indotto dal farmaco;
- trattare le recidive (Oliva et al.,2010).

Alcuni cani presenterebbero una diminuzione significativa dei livelli di anticorpi associati a un miglioramento clinico entro 6 mesi - 1 anno di trattamento, mentre altri potrebbero non avere una diminuzione dei titoli anticorpali nonostante il miglioramento clinico. Al contrario, un marcato aumento dei livelli di anticorpi dovrebbe essere interpretato come un marcatore di ricaduta, specialmente dopo l'interruzione del trattamento (Solano-Gallego et al., 2009).

In medicina veterinaria, l'allopurinolo (un analogo della purina) è considerato il farmaco principale di prima linea per il trattamento a lungo termine della CanL, spesso in combinazione con antimoniali pentavalenti o miltefosina per il primo mese e poi continuato da solo. Mentre è raramente utilizzato per il trattamento della leishmaniosi umana.

Si ritiene che l'associazione di antimonio di meglumina e allopurinolo abbia una migliore efficacia clinica rispetto all'associazione di miltefosina e allopurinolo nella CanL.

Il trattamento più frequentemente scelto per la CanL è l'antimonio di meglumina (antimoniale pentavalente) somministrato per via sottocutanea alla dose di 100mg/kg una volta al giorno per 1 mese, insieme all'allopurinolo (farmaco leishmaniostatico) somministrato per via orale 10 mg/kg ogni 12 ore per almeno sei mesi. La durata del trattamento dipende dalla gravità della malattia, dalla tolleranza individuale ai farmaci e dalla risposta clinica al trattamento.

Alcuni trattamenti a base di immunomodulatori, come il domperidone, possono migliorare i meccanismi di difesa innata, attivando cellule fagocitanti e potenziando l'uccisione intracellulare dei parassiti, il che può aiutare a prevenire la CanL e a ridurre il rischio di sviluppare la malattia clinica. Recentemente, uno studio ha registrato la cura parassitologica di cani con VL trattati con un'innovativa terapia combinata con antimonio di meglumina incapsulato nel liposoma e allopurinolo (Ribeiro et al., 2018).

Ci sono pochi farmaci disponibili, che hanno tutti gravi limitazioni, come l'alto costo, potenziale tossicità, regimi di trattamento lunghi e scomodi, notevoli effetti collaterali e fenomeni di resistenza (Reimão et al., 2020).

I composti principali (Tabella 5 e 6) che verranno trattati sono:

- Composti antimoniali
- Allopurinolo
- Amminosidina
- Amfotericina B
- Miltefosina
- Pentamidina
- Azoli
- Enrofloxacin
- Immunomodulatori

**TABLE I. Drugs in use for treatment of leishmaniasis, alone or co-administered**

Drug	Properties and administration	Comment
Sodium stibogluconate (Pentostam, SSG) and meglumine antimoniate (Glucantime)	Organo-metal complexes in polymeric forms. Pentostam contains around 33% and Glucantime around 28% pentavalent antimony, intravenous or intramuscular	For VL and CL. There is extensive drug resistance in Bihar India. Variable response in different species that cause CL. Generic sodium stibogluconate (SSG) has made treatment cheaper.
Amphotericin B (Fungizone)	Polyene antibiotic, fermentation product of <i>Streptomyces nodus</i> , intravenous	For VL, CL and complex forms of CL, e.g. mucocutaneous leishmaniasis. Has been first-line drug for VL in India where there is antimonial resistance.
Liposomal amphotericin B (AmBisome)	Unilamellar liposome, intravenous	Proved to be most effective lipid formulation for VL and available at \$18/50 mg ampoule via WHO. Also used for complex forms, such as PKDL and mucocutaneous leishmaniasis
Miltefosine	Hexadecylphosphocholine, oral	First oral drug for VL. Also effective against some species that cause CL. Contraindicated in pregnancy as found to be teratogenic in rats.
Paromomycin	Aminoglycoside (also known as aminosidine or monomycin), fermentation product of <i>Streptomyces rimosus</i> . Supplied as sulphate. Intramuscular for VL and topical for CL.	Registered for VL in India, completed phase III trials for VL in East Africa where less effective in Sudan. Topical formulation (12%) with methyl benzylmethonium chloride available for CL.
Amphotericin B formulations	Lipidic formulations, intravenous	Topical with gentamicin and surfactants in Phase III trial. Other lipid formulations, including Abelcet, Amphocil, Amphomul and multi-lamellar liposomes have been in clinical studies, mainly for VL.
Pentamidine	Diamidine, as isethionate salt, intramuscular	For specific forms of CL in South America only.

CL, cutaneous leishmaniasis; PKDL, post kala-azar dermal leishmaniasis; VL, visceral leishmaniasis.

Tabella 5. Farmaci in uso per il trattamento della leishmaniosi (Croft et Olliario, 2011)

Terapie di prima scelta		
Antimoniato di N-metilglucamina + Allopurinolo	75-100 mg/kg SC <i>sid</i> o 50 mg/kg SC <i>bid</i> 10 mg/kg <i>per os sid</i>	4-8 settimane Almeno 6-12 mesi
Miltefosina + Allopurinolo	2 mg/kg <i>per os sid</i> 10 mg/kg <i>per os bid</i>	4 settimane Almeno 6-12 mesi
Terapie di seconda scelta		
Amminosidina solfato + Antimoniato di N-metilglucamina	5,25 mg/kg SC <i>bid</i> 60 mg/kg SC <i>sid</i>	4 settimane 4 settimane
Amfotericina B	0,5 mg/kg IV ogni 72 ore	8 settimane

Tabella 6. Schema posologico per il trattamento della leishmaniosi canina (Alvar et al., 2004).

L'effetto collaterale più comune riscontrato con tutti questi farmaci è stato lo sviluppo di reazioni al sito di iniezione con una prevalenza simile tra i gruppi (Kasabalis et al., 2020).

## Allopurinolo

L'allopurinolo (approvato da FDA per l'uso nei cani, Figura 25) viene sempre somministrato per via orale. Ha effetto sinergico nella terapia della LCan, quindi è usato in molti protocolli

diversi. Dovrebbe essere usato con grande cautela in animali che presentano funzionalità renale ed epatica compromessa. Può interagire con altri farmaci quali azatioprina, metionina, cloruro di ammonio e furosemide. È un inibitore della xantina ossidasi (un enzima che catalizza la produzione di xantina da ipoxantina e di acido urico dalla xantina), portando a un'inibizione della sintesi delle proteine del parassita (Vulpiani et al., 2011). La sua attività contro il parassita dipende dall'incapacità di quest'ultimo di sintetizzare autonomamente le purine con la conseguente necessità di recuperare le basi azotate e i nucleosidi dall'ospite. Pertanto, viene metabolizzato e trasformato dal parassita in un analogo inattivo dell'inosina, nucleoside formato dall'unione di una molecola di ribosio con una di ipoxantina. Questo analogo, introdotto nell'RNA del patogeno, ne altera la traduzione delle proteine con effetti negativi sull'intero metabolismo del parassita (Baneth et Shaw, 2002).

Questo farmaco, comunque, nei confronti della *Leishmania* non ha azione parassitocida, ma solo parassitostatica. Nei tessuti dei mammiferi, al contrario, solo il 10% di allopurinolo viene convertito nell'analogo dell'inosina (il restante 90% è trasformato in ossipurinolo, composto totalmente inattivo), che non subisce nessuna conversione citotossica successiva. Per tale motivo, l'allopurinolo è considerato pressoché privo di effetti collaterali e comunque, quelli che si possono manifestare non attentano alla vita del soggetto in cura. Ha scarsi effetti collaterali (urolitiasi da xantina) e quindi può essere usato per lunghi periodi (Vulpiani et al., 2011). L'allopurinolo ha ricevuto ampio uso nell'uomo per il trattamento dell'iperuricemia.



Figura 25. Allopurinolo, formula di struttura. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Allopurinol>)

Quando viene incorporato dagli amastigoti intracellulari di *Leishmania*, l'allopurinolo viene trasformato in un composto tossico (4-amino-pirazolo-pirimidina) che uccide il parassita (Oliva et al., 2010).

Solano-Gallego et al. (2009) e Oliva et al. (2010) hanno delineato un protocollo basato sull'uso combinato di antimoniali e allopurinolo considerato come "trattamento di prima linea":

- antimonio di meglumina (MA) 75-100 mg/kg/SID S.C. per 4-8 settimane + allopurinolo (A) 10mg/kg/BID o una volta al giorno se presente xantinuria, P.O. per almeno 12 mesi (Monteiro et al., 2021).
- MA 50-75 mg/kg/BID S.C. per 1-2 mesi + A 10-20 mg/kg/die P.O. per 1-8 mesi.

La combinazione di antimonio di meglumina e allopurinolo è il trattamento più comune per la leishmaniosi nei cani, anche se non porta a una completa cura parassitologica. I cani trattati con la combinazione riferiscono che hanno un periodo più lungo di remissione clinica rispetto a quelli trattati con uno dei due farmaci da solo. Il protocollo più comune consiste nell'antimonio di meglumina somministrato SC alla dose di 100 mg/kg, una volta al giorno per 1 o 2 mesi in combinazione con allopurinolo somministrato PO a 10 mg/kg (4,5 mg/lb) ogni 12 ore per diversi mesi. Gli effetti avversi associati alla combinazione sono gli stessi di quelli riportati per la somministrazione di uno dei due agenti da soli (Oliva et al., 2010).

Durante il trattamento devono essere monitorati i parametri clinicopatologici, compresi l'emocromo completo, il profilo biochimico, l'elettroforesi delle proteine del siero e l'analisi delle urine, dopo il primo mese dall'inizio dell'infezione e poi almeno ogni 3-4 mesi.

Per limitare gli effetti collaterali, le dosi possono essere rimodulate in base alle funzioni renali ed epatiche:

- MA 75 mg/kg/BID S.C. + A 20mg/kg/SID P.O. sono stati utilizzati in cani con GOT, GPT, BUN e creatinina nella norma;
- MA 50 mg/kg/SID S.C. e A 20 mg/kg/SID P.O. sono stati utilizzati in cani con insufficienza epatica o renale.

Il momento di interrompere il trattamento antimoniale è stato deciso sulla base dei risultati dell'elettroforesi delle proteine del siero, continuando il trattamento fino a quando l'albumina/globulina era  $\geq 0.80$  (Vulpiani et al., 2011).

Negli esseri umani con leishmaniosi, l'allopurinolo ha scarsa efficacia se somministrato come monoterapia. La bassa attività è probabilmente attribuibile all'insufficiente trasformazione dell'allopurinolo in ossipurinolo, che è la forma chimica che produce il suddetto composto tossico. Negli esseri umani trattati per la leishmaniosi, la combinazione di allopurinolo e antimoniali permette una riduzione del dosaggio dell'antimonio pentavalente.

Quando viene somministrato ai cani come singolo agente anti-*Leishmania* per un periodo minimo di 2 o 3 mesi, l'allopurinolo di solito porta a un moderato miglioramento clinico e parziale ripristino di alcuni analiti di laboratorio entro i range di riferimento, come le proteine della fase acuta dell'infiammazione.

Gli autori considerano la combinazione dei seguenti criteri sufficienti per interrompere il trattamento con allopurinolo:

- presenza di un completo recupero fisico e clinico-patologico valutato da un accurato esame fisico, emocromo, pannello biochimico completo e analisi delle urine almeno 1 anno dopo la somministrazione iniziale di allopurinolo;
- marcata diminuzione dei livelli di anticorpi (negativi o borderline positivo con un test sierologico quantitativo).

È importante sottolineare che alcuni cani estremamente suscettibili non arrivano mai a un punto che permetta l'interruzione dell'allopurinolo, mentre altri meno suscettibili sarebbero

in grado di controllare l'infezione senza un trattamento estremamente lungo (Solano-Gallego et al., 2009).

Similmente a quanto accade con i farmaci antimoniali per il trattamento della LCan, l'allopurinolo non implica una cura parassitologica completa e, pertanto, si verificano ricadute quando il trattamento viene interrotto. Per questo motivo, l'allopurinolo viene solitamente somministrato per periodi lunghi fino a diversi mesi. La somministrazione a lungo termine di allopurinolo in aggiunta all'uso a breve termine di farmaci leishmanicidi, come l'antimoniato di meglumina e la miltefosina, è considerata obbligatoria, non solo per migliorare l'efficacia terapeutica ma anche per evitare ricadute (Kasabalis et al., 2020).

La tollerabilità del farmaco è eccellente e sembra rallentare il deterioramento della funzione renale nei cani con proteinuria ma senza insufficienza renale. I dosaggi più comunemente prescritti di allopurinolo variano tra 5 e 20 mg/kg, PO, ogni 12 ore per 2-24 mesi (Oliva et al., 2010).

Ci sono pochi effetti avversi riportati dall'uso di allopurinolo in cani. In medicina umana, ci sono state segnalazioni di disturbi gastrointestinali, eruzioni cutanee e problemi al fegato. Se somministrato per un lungo periodo, vi è il rischio di sviluppare calcoli vescicali insoliti, chiamati calcoli di xantina.

## Antimonio Pentavalente

Un farmaco di prima scelta per la maggior parte delle forme di leishmaniosi è l'antimonio pentavalente (Sb, Figura 26), che è presente nell'antimoniato di N-metilmeglumina (nome commerciale "Glucantime" o "Glucantim") o stibogluconato di sodio (nome commerciale "Pentostam", farmaco non disponibile in Italia).

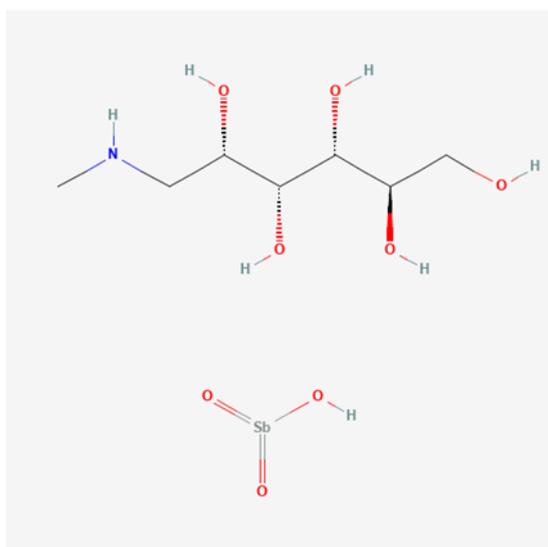


Figura 26. Antimonio di meglumina, formula di struttura (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64953>)

Il preciso meccanismo d'azione di Sb nella leishmaniosi non è ben chiaro: probabilmente agisce direttamente sui processi molecolari del parassita influenzando l'attività dei macrofagi. Pertanto, il trattamento con composti Sb induce una generalizzata riduzione del carico di parassiti, insieme ad un temporaneo ripristino della risposta immunologica cellulo-mediata e una diminuzione dei titoli anticorpali sierici specifici (McGwire et al., 2014).

Tra i suoi effetti biochimici ricordiamo l'inibizione della topoisomerasi I del DNA, l'interferenza con il glutatione peculiare dei tripanosomatidi (il tripanotione) e degli enzimi glicolitici.

Per uso sistemico, può essere somministrato per via endovenosa (IV) o intramuscolare (IM); ma può anche essere usato intralesionalmente (IL) per trattare la CL.

Ha una breve emivita: 21, 42 e 122 minuti quando viene somministrato IV, IM, e SC, rispettivamente.

In entrambe le specie in esame (umana e canina), da 6 a 9 ore dopo la somministrazione, dall'80% al 95% di meglumina antimonio viene eliminato attraverso i reni (Alias-Molero et al., 2021). Durante il trattamento, il miglioramento clinico insieme al miglioramento dei valori ematologici e biochimici del siero è solitamente osservato dopo un periodo di una o più settimane (Oliva et al., 2010). Il rischio di tossicità del farmaco risulta essere più elevato nel caso di ridotta velocità di filtrazione glomerulare (Solano-Gallego et al., 2009).

Il trattamento con antimonio di meglumina non porta alla completa eliminazione di *Leishmania* dai cani infetti. Piuttosto, alcuni mesi dopo il trattamento, i parassiti possono ancora essere rilevati nei tessuti di cani clinicamente guariti (Ikeda-Garcia et al., 2006).

Il regime di trattamento più comunemente riportato è di 100 mg/kg di meglumina antimonio, una volta al giorno per 4 settimane. A causa delle proprietà farmacocinetiche dei composti Sb, il dosaggio potrebbe essere meglio diviso in 2 dosi giornaliere di 50 mg/kg (Oliva et al., 2010).

La terapia sistemica è usata in combinazione con altri agenti in alcuni casi, come la paromomicina (15 mg/kg/die IM) per abbreviare il corso complessivo di tutta la terapia a 17 giorni. È stato usato insieme alla pentossifillina, un inibitore del TNF- $\alpha$  (400 mg per via orale/giorno), per il trattamento della CL causata da *L. major* e nel MCL dove ha dimostrato di essere più efficace del solo antimonio nel portare alla cura completa e nell'abbreviare il tempo di cura.

Gli effetti collaterali sono comuni con l'uso sistemico dell'antimonio, il più grave di questi è la cardiotoxicità (aritmie, prolungamento del Q-T e morte improvvisa), seguita da elevazione degli enzimi epatici e pancreatici, pancitopenia e anomalie elettrolitiche che richiedono un attento monitoraggio dei pazienti durante il corso della terapia (McGwire et al., 2014). Spesso, però, diventa difficile distinguere gli effetti collaterali dei farmaci antimoniali dai sintomi legati al progredire della malattia. Il dolore e il gonfiore del sito di iniezione sono gli effetti avversi più comuni degli antimoniali, insieme a febbre, diarrea, perdita di appetito e un aumento transitorio dell'alanina aminotransferasi sierica e delle attività amilasiche.

Comunemente si possono verificare ricadute cliniche dopo il trattamento, in un periodo che va da mesi a 1-2 anni e sono più comuni quando la durata del trattamento è inferiore a 4 settimane.

L'inizio del trattamento antimoniale al sorgere dei primi sintomi di leishmaniosi, insieme alla corretta gestione delle ricadute recidive, può portare alla sopravvivenza per 4 anni nel 75% dei cani trattati (Oliva et al., 2010).

L'emergere di ceppi di *L. infantum* con ridotta suscettibilità e/o resistenza all'antimoniato di meglumina e agli altri farmaci di prima linea per il trattamento della LCan (miltefosina, allopurinolo) è allarmante. Cicli multipli di trattamento con meglumina antimoniato sono stati associati allo sviluppo di parassiti resistenti e quindi dovrebbero essere evitati. Sulla base di questi risultati, si può considerare l'amminosidina un'alternativa utile all'antimoniato di meglumina nei cani che necessitano ripetute somministrazione di farmaci leishmanicidi per controllare le ricadute cliniche della LCan. Tuttavia, si consiglia cautela quando l'amminosidina viene usata in cani malati sospettati di essere resistenti all'antimoniato di meglumina, perché la resistenza crociata in vitro tra questi due farmaci è stata descritta sia nei cani sia negli esseri umani (Kasabalis et al., 2020).

## Associazione Antimoniato di meglumina/Allopurinolo

L'associazione tra i due farmaci è il protocollo più utilizzato nella terapia della leishmaniosi del cane. I soggetti trattati con la combinazione dei due farmaci hanno una remissione più duratura se paragonata a quella ottenuta con l'utilizzo delle due sostanze in monoterapia. Un altro dato interessante è la buona tollerabilità di tale associazione farmacologica (Monteiro et al., 2021).

Allo stato attuale, tuttavia, nonostante un'ampia utilizzazione dei due farmaci in numerosi lavori sperimentali, non esiste un protocollo di riferimento. Nella pratica, il protocollo più frequentemente utilizzato è quello che prevede l'uso di Antimoniato di N-metilglucamina alla dose di 100 mg/kg SID SC (o 50 mg/kg BID SC) per uno-due mesi, unitamente alla somministrazione di allopurinolo alla dose di 10 mg/kg BID PO, da protrarre per molti mesi dopo la remissione clinica. Anche l'associazione Antimoniato di N-metilglucamina e Allopurinolo, pur utilizzata per lunghi periodi, non determina la guarigione parassitologica. Le ricidive sono possibili nonostante il protrarsi della terapia. (Oliva et al., 2008)

## Amfotericina B

Il trattamento "classico" di seconda scelta per la terapia della LCan è l'amfotericina B (Figura 27): oltre ad essere un classico antifungino, è anche un farmaco leishmanicida molto potente che viene somministrato preferibilmente per via endovenosa lenta, sebbene sia stata suggerita anche la somministrazione sottocutanea.

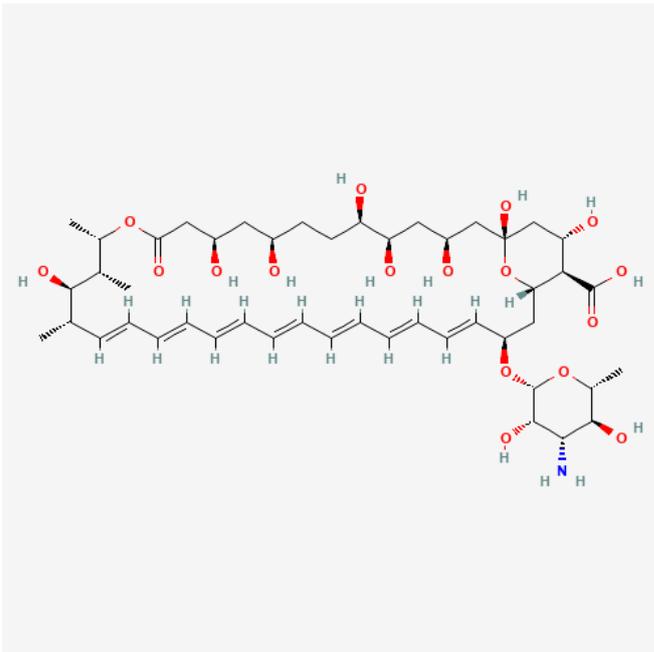


Figura 27. Amfotericina B, formula di struttura (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280965>)

La sua attività si esplica su un target specifico costituito dal gruppo degli ergosteroli, che rappresentano i principali steroli della membrana citoplasmatica di *Leishmania* oltre che dei funghi e determina pori di membrana responsabili della perdita di ioni potassio e magnesio e della successiva morte del parassita. L'amfotericina B mostra però una certa affinità anche per il colesterolo, fondamentale costituente lipidico delle membrane cellulari dei mammiferi e per questo peculiare meccanismo d'azione, la sostanza non è priva di effetti tossici importanti, in particolar modo a livello dei nefroni; oltre alla vasocostrizione renale, può causare febbre, vomito, anoressia e periflebite. La somministrazione di amfotericina B, quindi, richiede un accurato monitoraggio delle funzioni renali durante il trattamento ed occorre ricorrere a temporanee interruzioni della terapia se il livello della creatinina si eleva sopra i normali valori fisiologici.

Ha avuto scarso utilizzo nel passato a causa di effetti collaterali che si manifestano all'atto dell'infusione (febbre, brividi e dolori alle ossa) e a più lungo termine (tossicità renale) alle dosi usuali di 1-1,5 mg/kg die. Inoltre, la via di somministrazione intravenosa è considerata anch'essa uno svantaggio. Per gli evidenti limiti della terapia antimoniale, e soprattutto grazie alla messa a punto di dosaggi e formulazioni molto meno tossici del farmaco, l'amfotericina B è stata impiegata sempre più di frequente nella VL (leishmaniosi viscerale) e attualmente costituisce il principale progresso consolidato nella chemioterapia della leishmaniosi avvenuto negli ultimi anni (Gradoni et al., 2001).

Ad oggi, l'amfotericina B liposomiale (AmBisome) sembra sostituire l'antimoniato nel trattamento della VL pediatrica dovuta a *L. infantum* (Minodier et Parola, 2007).

Un importante svantaggio dell'amfotericina B è la sua grave nefrotossicità, con conseguente diminuzione del tasso di filtrazione glomerulare ed aumento dei livelli di creatinina e azoto ureico nel siero.

Gli effetti collaterali ed i costi notevoli ne limitano enormemente l'impiego nelle forme cutanee.

Nel cane, a differenza di quanto avviene nell'uomo, induce una rapida guarigione clinica, ma non dovrebbe essere utilizzato in medicina veterinaria, per evitare il progredire dei parassiti resistenti.

Nella leishmaniosi vengono utilizzati il desossicolato e le formulazioni incapsulate liposomicamente per diminuire la tossicità di amfotericina B (nome commerciale 'AmBisome'), ma queste ultime presentano costi elevati (McGwire et al., 2014).

La formulazione convenzionale (amfotericina B desossicolato, Fungizone) è stata somministrata al basso dosaggio di 0,5 mg/kg IV. a giorni alterni per 28 giorni (dose totale di 7 mg/kg) ed ha permesso la guarigione completa nel 98-100% di pazienti indiani affetti da VL resistente a Sb, con effetti collaterali trascurabili.

Una dose totale molto più alta (0,7 mg/kg die per 28 giorni) è risultata invece inefficace per il trattamento della VL in pazienti HIV positivi, producendo solo il 62% di cura iniziale e provocando eventi avversi nel 36% dei pazienti.

Una formulazione liposomiale dell'amfotericina B (AmBisome) si è dimostrata altamente efficace e priva di tossicità a dosaggi giornalieri di 2-4 mg/kg IV nel trattamento sperimentale della VL da *L. infantum* in un modello murino. Uno studio clinico di tipo aperto e multicentrico, condotto in Italia, ha dimostrato un'efficacia prossima al 100% di una dose totale di circa 20 mg di AmBisome/kg, somministrata in 6 dosi nell'arco di 10 giorni. Questo regime si è rivelato di alto costo/beneficio soprattutto nei casi pediatrici, richiedendo poca quantità di farmaco e solamente 5-6 giorni di ospedalizzazione contro le 3-4 settimane necessarie per un trattamento con antimoniali. Sulla base dei dati riportati in questi studi, l'AmBisome è stato il primo farmaco approvato per il trattamento della VL dal Food and Drug Administration degli Stati Uniti.

Questo regime di AmBisome si è però mostrato inefficace in pazienti HIV positivi co-infetti da *L. infantum*, ed uno studio ha messo in evidenza che persino una dose totale doppia (40 mg/kg), somministrata nell'arco di un mese, non impedisce il verificarsi di ripetute recidive di VL in questi soggetti immunodepressi.

Una seconda formulazione lipidica dell'amfotericina B, costituita da una dispersione colloidale in colesterolo (Amphocil), a differenza dell'Ambisome, si è rivelata moderatamente tossica, tanto da essere sconsigliata per la terapia della VL pediatrica, potendo provocare problemi respiratori in pazienti al di sotto di sei anni. Uno studio condotto su adulti italiani ha confermato l'efficacia dell'Amphocil alle dosi di 2 mg/kg/die IV per 5-7 giorni, per una dose totale di 10-14 mg/kg anche per la terapia della VL mediterranea.

Una terza formulazione lipidica dell'amfotericina B (lipid complex, Abelcet) è stata utilizzata alla dose di 3 mg/kg/die IV per 5 giorni (per una dose totale di 15 mg/kg) per la terapia di VL resistente a Sb. Mentre l'attività parassitocida è risultata eccellente (100% di cura), gli effetti collaterali riportati sono stati di una certa entità.

L'insieme dei risultati ha mostrato in generale il seguente ordine di efficacia basato sugli indici di ED50: AmBisome > Amphocil > Abelcet > Fungizone. Tale sequenza può essere letta al contrario per ciò che riguarda la tossicità e (purtroppo) il costo (Gradoni et al., 2001).

Il protocollo raccomandato nell'uomo prevede la somministrazione di dosi da 0,1 a 1 mg/kg/SID due volte a settimana (dosi inferiori quando la somministrazione è quotidiana) per via endovenosa per due mesi.

Sperimentalmente, l'amfotericina B liposomiale viene utilizzata nei cani alla dose di 3mg/kg/SID IV per cinque giorni consecutivi, per via endovenosa: i risultati sono buoni, ma i segni clinici di solito riappaiono dopo 4-6 mesi (Vulpiani et al., 2011).

Effetti collaterali comuni dell'amfotericina B sono l'insufficienza renale e le anomalie elettrolitiche, che sono entrambe minori con la forma liposomiale, tuttavia questa formulazione è più costosa, il che ne limita l'uso diffuso (McGwire et al., 2014).

## Miltefosina

Un altro farmaco di prima linea, la miltefosina (Figura 28), originariamente studiato come agente antineoplastico negli esseri umani, è usato per il trattamento della VL umana.

La sua efficacia come farmaco leishmanicida orale è nota già dalla metà degli anni '80, ma è stata dimostrata sia in vivo che in vitro agli inizi degli anni '90 in diversi modelli sperimentali. Solo recentemente sono stati condotti studi clinici controllati sull'uomo che hanno permesso alla miltefosina di essere introdotta nel panorama delle terapie anti *Leishmania* nell'uomo e di rappresentare, ad oggi, il primo trattamento orale per la VL. Tali studi sono stati eseguiti, in stretta collaborazione, dal governo indiano, dalla casa farmaceutica Zentaris e dal TDR (Tropical Diseases Research), un programma sponsorizzato dall'United Nations Development Program, la World Bank e la WHO.

Chimicamente è un'alchilfosfocolina e come tale è in grado di interferire sui segnali metabolici cellulari e sulla permeabilità delle membrane cellulari nonché sulla loro composizione lipidica; interferisce con il metabolismo dei fosfolipidi nella sintesi della parete cellulare e con quello del glicosilfosfatidil – inositolo che permette la sopravvivenza del parassita all'interno del macrofago (Oliva et al., 2010). Aiuta a ridurre il carico dei parassiti e a migliorare i sintomi clinici, ma sono state descritte ricadute con la monoterapia con miltefosina.

Il meccanismo d'azione si esercita colpendo la via del metabolismo dei fosfolipidi del parassita, interferendo con le vie di comunicazione cellulare e inibendo la sintesi della membrana cellulare parassitaria. Le modalità d'azione del farmaco sono rappresentate dall'inibizione della biosintesi dei recettori del GPI (glicosilfosfatidil-inositolo), molecola chiave per la sopravvivenza intracellulare degli amastigoti e dall'alterazione del segnale di trasduzione agendo sulle fosfolipasi C e proteinchinasi C *Leishmania* specifiche. Ne consegue la morte per apoptosi della cellula protozoaria (Sundar et Olliaro, 2007).

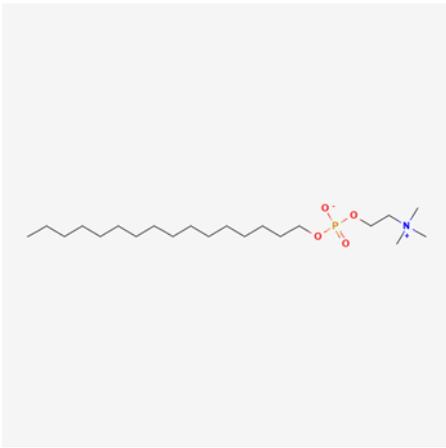


Figura 28. Miltefosina, formula di struttura (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3599>)

Nell'anno 2007 l'azienda farmaceutica Virbac ha immesso in commercio in Italia il primo farmaco per uso veterinario a base di miltefosina (Milteforan<sup>®</sup>, soluzione orale per cani) (<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2007/10/15/07A08692/sg>).

Nel 2011, è stato aggiunto al Modello di lista dei farmaci essenziali dell'OMS ed è stato considerato un agente cruciale per il successo del programma di eliminazione, in quanto permette il trattamento ambulatoriale di molti pazienti contemporaneamente (Reimão et al., 2020).

Il farmaco è stato recentemente registrato per la somministrazione orale nei cani affetti da leishmaniosi in diversi paesi europei. Viene somministrato oralmente a 2 mg/kg per cicli di 28 giorni in associazione con allopurinolo (10 mg/kg BID, con somministrazione orale per 6 mesi, Vulpiani et al., 2011) e induce una rapida guarigione clinica e parassitologica nel 91% - 95% dei pazienti affetti da leishmaniosi. Non è ancora stato sufficientemente sperimentato nel cane (Apostolopoulos et al., 2018). Poiché la somministrazione è orale, vengono bypassati i costi elevati e l'ospedalizzazione necessari nel caso di farmaci parenterali, come gli antimoniali.

Dopo la somministrazione orale, raggiunge la concentrazione massima tra le 4 e le 48 ore, in un lento ma completo assorbimento negli animali (ratti e cani), con una biodisponibilità assoluta (che non è mai stata valutata nell'uomo) del 82%-94%. Il tempo di assorbimento gastrointestinale stimato era di 1,67 h in un modello farmacocinetico a due compartimenti, impiegando almeno 2 settimane per raggiungere i livelli ematici terapeutici. Si lega preferenzialmente all'albumina del siero e in misura minore a lipoproteine a bassa densità. Presenta un'ampia distribuzione e un elevato accumulo durante il trattamento, mostrando livelli particolarmente elevati nei reni, mucosa intestinale, fegato e milza (in questo ordine). Le concentrazioni allo stato stazionario potrebbero essere raggiunte in tutti gli organi e siero tranne che nei reni e nel cervello. Le più alte concentrazioni di farmaco sono state osservate nelle ghiandole surrenali, nei reni, nella milza e nel fegato. Il passaggio attraverso la placenta o il cordone ombelicale non è stato studiato ancora, ma i risultati indicano che questa evenienza è possibile.

A causa della lunga emivita del farmaco (>6 giorni), le concentrazioni plasmatiche non sembravano raggiungere uno steady-state alla fine del trattamento (cioè il giorno 28). La

degradazione è mediata dalle fosfolipasi C o D, rilasciando rispettivamente esadecanolo e colina. Molto poco viene escreta intatta; piuttosto, viene ampiamente metabolizzata.

L'esadecanolo può essere ossidato ad acido palmitico ed entrare nei lipidi nella biosintesi lipidica o nella beta-ossidazione, mentre la colina viene successivamente utilizzata per la sintesi dell'acetilcolina o della lecitina.

Quasi completamente eliminato dai processi metabolici, ha una clearance plasmatica estremamente lenta, un'emivita di eliminazione primaria di circa 7 giorni e un'emivita di 31 giorni, stimata da un modello farmacocinetico a due compartimenti.

Il sistema gastrointestinale è il sito principale per gli effetti collaterali (limitanti la dose) come perdita di appetito, lieve nausea, vomito e diarrea, che possono portare a uno squilibrio di liquidi; la reidratazione può essere necessaria nei casi gravi. Questo squilibrio, oltre all'impatto diretto della miltefosina sui reni, può contribuire ad un aumento dei livelli di creatinina. La gravità di questi effetti collaterali diminuisce con l'assunzione di cibo e durante il trattamento. Manifestazioni gastrointestinali, epatotossicità e nefrotossicità sono i principali effetti collaterali, che possono aumentare i costi della terapia, poiché richiedono continuo monitoraggio. Un lieve aumento dei livelli sierici di alanina aminotransferasi (ALT) e aspartato aminotransferasi (AST) può essere osservato nella prima settimana di trattamento, normalizzandosi nelle settimane successive. Altri effetti collaterali includono dolore addominale, vertigini, mal di testa, sonnolenza, prurito cutaneo e anomalie negli esami del fegato o dei reni. Poiché c'è un rischio di embriotossicità, fetotossicità e teratogenicità, l'uso di contraccezione efficace per tutta la durata del trattamento e per altri 2-4 mesi dopo l'ultima dose è raccomandato. Nei pazienti con HIV, la miltefosina è da preferirsi ai trattamenti con Stibogluconato di sodio.

Questa forma di terapia sembra molto valida, perché, essendo di nuova introduzione, e ben lontana dall'indurre farmaco resistenza, a differenza dei farmaci più tradizionali come gli antimoniali, anche se la sua prolungata emivita (150-200 ore) non la può escludere.

Promuove un rapido aumento dei leucociti e delle piastrine all'inizio del all'inizio del trattamento, che può essere benefico per pazienti con VL che di solito hanno pancitopenia. Di solito, gli effetti avversi sono più pronunciati nella prima settimana di trattamento, diminuiscono con il tempo (anche se i livelli del farmaco aumentano), probabilmente a causa della diminuzione del carico di parassiti (Reimão et al., 2020).

L'aderenza al trattamento deve essere garantita per evitare la selezione di linee resistenti del parassita. La Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti raccomanda come dosaggio di miltefosina (nomi commerciali 'Impavido' e 'Miltex') una capsula da 50 mg due volte al giorno per 28 giorni consecutivi (per persone che pesano da 30 a 44 kg) e una capsula da 50 mg tre volte al giorno per 28 giorni consecutivi (per persone che pesano 45 kg o più).

Dal 2006, il MF è stato usato anche nel trattamento della PKDL (leishmaniosi dermica post kala-azar) in regimi più lunghi, che vanno da 6 a 16 settimane, con un tasso di guarigione stimato fino al 90% (Reimão et al., 2020).

Da alcuni studi, si può evincere che questo farmaco potrebbe essere efficace in pazienti co-infetti dall'HIV (risulta essere infatti più sicuro rispetto ai composti antimoniali, ma meno efficace). L'attività preclinica antileishmania della miltefosina contro diverse specie di

*Leishmania* è stata verificata, sia in vitro che in vivo. In generale, questi studi hanno dimostrato che l'attività in vitro differisce a seconda della specie di *Leishmania* (Reimão et al., 2020).

Ci si è chiesti se la monoterapia standard debba essere sostituita da una combinazione di farmaci, che potrebbero avere un impatto positivo sul risultato del trattamento ed evitare la selezione di linee del parassita resistenti ai farmaci. La terapia multifarmaco può evitare, pertanto, che *Leishmania* acquisisca resistenza ai farmaci e potrebbe essere una strategia più efficace, servendosi di dosaggi inferiori e presentando meno effetti collaterali in un trattamento più breve (Ponte-Sucre et al., 2017).

Il criterio razionale per scegliere una terapia di combinazione dei farmaci include la riduzione del tempo del trattamento, la riduzione della tossicità e l'aumento della compliance e l'aderenza dei pazienti, prolungando così la durata della vita terapeutica dei farmaci. Inoltre, la combinazione di farmaci può anche prevenire la selezione di parassiti resistenti ai farmaci. Pertanto, gli studi clinici dovrebbero essere condotti al fine di scoprire quali combinazioni presenteranno effetti sinergici o effetti additivi su diversi bersagli, aumentando così l'attività antileishmaniale. Anche se altamente efficace, la miltefosina usata come monoterapia non deve essere incoraggiata in programmi su larga scala. Tuttavia, dovrebbe essere considerato come un potenziale candidato per un regime di combinazione multi-farmaco (Sundar et Chakravarty, 2015).

Questo farmaco presenta enormi vantaggi, in quanto la sua somministrazione orale ha permesso di trattare un maggior numero di pazienti nelle strutture di assistenza primaria. Tuttavia, anche se la miltefosina orale viene descritta come "ben tollerata", sicuramente l'alta incidenza e gravità di vomito e diarrea suggerisce il contrario e potrebbe contribuire a una scarsa compliance del paziente. La tossicità embriofetale è anche una questione importante: è necessario eseguire un test di gravidanza prima del trattamento e mantenere un'adeguata copertura contraccettiva (preferibilmente contraccezione non orale a causa del vomito) per cinque mesi dopo la terapia. Inoltre, le credenze culturali e religiose sono ostacoli alla contraccezione, per non parlare dell'accesso e del costo dei test di gravidanza e di un'adeguata copertura contraccettiva nelle regioni povere. Queste questioni escludono effettivamente il trattamento con miltefosina per le donne in età fertile in alcune regioni endemiche. Inoltre, il declino nell'efficacia del farmaco e l'alto tasso di ricaduta nella VL e nella PKDL, è fonte di grande preoccupazione. A causa di ciò, non è più ampiamente utilizzato in alcune regioni endemiche e il trattamento di prima linea preferito è diventato l'amfotericina B a dose singola, che supera gli svantaggi principali della miltefosina (il suo potenziale teratogeno e la terapia lunga un mese). Tuttavia, il trattamento con amfotericina B ha anche delle limitazioni, come la necessità di una catena del freddo. Pertanto, le attuali limitazioni del trattamento della VL hanno fornito il razionale per la ricerca essenziale sulla terapia combinata e l'identificazione di nuove entità chimiche (il farmaco NMT-A02 ha dimostrato di essere meno tossico della miltefosina. Attualmente il farmaco è ancora in studio ma ha dimostrato il superamento dei trials clinici sui cani). La scoperta di farmaci più efficaci per la VL dovrebbe essere una priorità se si vuole eliminarla con successo.

La sua efficacia come monoterapia sta diventando più ridotta, ma i fallimenti terapeutici sono stati attribuiti alla bassa esposizione nei pazienti pediatrici. Anche se altri trattamenti siano stati proposti per sostituire la miltefosina, il farmaco resta ancora un'opzione importante nella terapia della VL, associato ad un altro farmaco, o in pazienti HIV e pazienti pediatrici e nei casi di PKDL, essendo anche utile nel trattamento della CL (leishmaniosi cutanea) e della ML (leishmaniosi mucosale). Un'altra questione chiave è l'accesso limitato al farmaco, come conseguenza della bassa produzione e dei prezzi elevati. È comunque l'unico farmaco orale disponibile per la chemioterapia della VL ed è ancora altamente efficace contro questa forma della malattia (Reimão et al., 2020).

## Amminosidina

L'amminosidina (chiamata anche paromomicina, Figura 29), approvata dalla FDA per l'uso nei cani, è un antibiotico a basso costo prodotto da Park Davis (ora Pfizer) ottenuto da *Streptomyces krestomuceticus*, appartiene alla classe degli aminoglicosidi, possiede attività antimicrobica e antiprotozoaria (Alias-Molero et al., 2021). Anche se sviluppata nel 1960 come agente anti-*Leishmania*, è rimasta trascurata fino agli anni '80 quando le formulazioni topiche e sistemiche si sono rivelate efficaci nel trattamento della leishmaniosi umana.

Ha attività leishmanicida e riesce ad attraversare la membrana cellulare grazie ad una proteina carrier che si forma nei microrganismi sensibili e raggiunge alte concentrazioni intracellulari, capaci di inibire la sintesi delle proteine interferendo nel legame tra l'aminoacyl transfer RNA e le subunità ribosomiali 30 S. Ne consegue la produzione di proteine anomale incapaci di assolvere alla loro normale funzione. A questo primo importante meccanismo, si aggiunge un'alterazione della permeabilità della membrana cellulare, con perdita di elementi essenziali (Kasabalis et al., 2020). Inoltre, induce disfunzione respiratoria nei promastigoti di *L. donovani*. Come anticipato, l'amminosidina è stata usata con successo nel trattamento degli esseri umani con leishmaniosi, il 95% dei quali sono risultati parassitologicamente curati quando trattati con un dosaggio di 11 mg/kg, IM, una volta al giorno, per 21 giorni. Il farmaco è stato usato nei cani come agente singolo e in combinazione con antimonio di meglumina. La paromomicina viene usata parenteralmente per la VL, e topicamente e parenteralmente per la leishmaniosi cutanea (Daga et al., 2021). Se somministrata per via sottocutanea o intramuscolare rimane in circolo per circa cinque ore e solo una minima parte viene assorbita a livello intestinale, mentre la maggior parte viene escreta quasi esclusivamente per via renale. Il protocollo di amminosidina più comunemente usato nei cani è di 5 mg/kg, SC, una volta al giorno per 3 settimane, più 60 mg di meglumina antimonio/kg, IM, ogni 12 ore per 4 settimane. La combinazione permette risultati clinici e parassitologici migliori che con entrambi i farmaci da soli.

Un'altra combinazione possibile di amminosidina-allopurinolo non può essere proposta come trattamento di prima linea di CanL ma piuttosto come un trattamento di seconda linea che può essere particolarmente utile per evitare ripetute somministrazioni di antimonio di meglumina o come alternativa nei paesi in cui quest'ultimo non è disponibile o registrato (Kasabalis et al., 2020).

Gli effetti collaterali principali si manifestano a livello gastrointestinale e comprendono nausea, vomito, dolori addominali crampiformi e diarrea. A dosi elevate ha un'azione curarizzante, e può essere responsabile di reazioni allergiche. Una grave limitazione per un uso più diffuso dell'amminosidina è legata ai suoi effetti tossici e vestibolari (Oliva et al., 2010). Viene sconsigliato l'uso di questo farmaco nei soggetti con compromessa funzionalità renale. Il prezzo basso e la scarsa tossicità, la breve durata del trattamento e l'efficacia sembrano rendere questo antibiotico un trattamento di prima linea per la leishmaniosi. Purtroppo, si generano facilmente resistenze se usato in monoterapia (Alias-Molero et al., 2021).

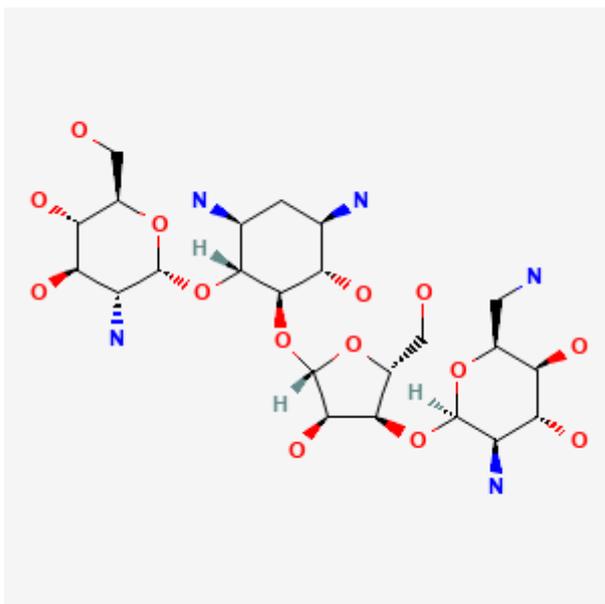


Figura 29. Amminosidina, formula di struttura (Davidson et al., 2008)

Dopo aver revisionato degli studi pubblicati fino al 2004, si è concluso che c'era una discreta evidenza per non raccomandare l'amminosidina a dosi superiori a 20 mg/kg e una discreta evidenza scientifica per raccomandarla al regime di dosaggio di 5 mg/kg, due volte al giorno. Tuttavia, studi più recenti hanno mostrato che la somministrazione sottocutanea (SC) di amminosidina ad un regime di dosaggio ottimizzato (15 mg/kg, una volta al giorno) per 21 giorni, porta ad efficaci concentrazioni plasmatiche di picco e, almeno a breve termine, al miglioramento clinico e clinico-patologico e alla riduzione della carica parassitaria, senza effetti collaterali (Kasabalis et al., 2020).

## Pentamidina

La Pentamidina (Figura 30) è un composto aromatico diamminico dotato di notevole attività antiprotozoaria ed antifungina. I precisi meccanismi antimicrobici della pentamidina (nomi commerciali "Pentacrinat" e "Pentam") sono sconosciuti ma il farmaco interferisce con la biosintesi di macromolecole come DNA, RNA, fosfolipidi e proteine, quindi provocando danni al cinetoplasto e al complesso mitocondriale del patogeno. È stato usato (dosi IV di 4 mg/kg

ogni due giorni per 3-5 giorni) per il trattamento della CL sudamericana causata da *L. guyanensis* e *L. panamensis*, e ci sono alcuni dati che dimostrano che è anche efficace nella CL del Vecchio Mondo causata da *L. tropica* e *L. major* così come nelle lesioni cutanee di *L. infantum* (McGwire et al., 2014).

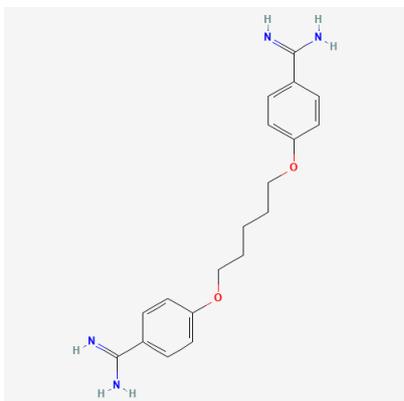


Figura 30. Pentamidina, formula di struttura (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4735>)

Nell'uomo, a differenza dei composti antimoniali, la Pentamidina dopo somministrazione parenterale, si accumula nel fegato e nei reni, attraverso i quali viene eliminata molto lentamente (50% della dose in 5 gg). Analogamente agli altri composti diamminici può causare numerosi effetti collaterali acuti (ipotensione, nausea, vomito, scialorrea, diarrea, shock anafilattico) e cronici (ipoglicemia, diabete, danni epato-renali, trombocitopenia). Somministrata per via intramuscolare, inoltre, la Pentamidina isotionato, forma salina normalmente presente nelle preparazioni in commercio, è fortemente istolesiva, tanto da provocare la formazione di ascessi nel punto di inoculo. La dose di 4 mg/kg SID IM per 3 cicli di 8 giorni, con intervallo di una settimana, ha consentito di ottenere un buon miglioramento clinico, associato alla riduzione della risposta umorale ed al miglioramento della risposta cellulo-mediata (Oliva et al., 2008).

## Domperidone

Praticamente nessun trattamento eliminerà completamente i flebotomi dall'animale infetto, e anche se si ottenesse una remissione clinica temporanea, ci si dovrebbe comunque aspettare una ricaduta settimane o anni dopo la sospensione del farmaco (Gomez-Ochoa et al., 2009).

Tuttavia, le opzioni di trattamento attualmente disponibili sono limitate.

La suscettibilità della *Leishmania* agli antimoniali, all'amfotericina B e all'amminosidina diminuiscono progressivamente (Pennisi et al., 2005). I limiti della terapia antimoniale nei cani (induzione di resistenza del parassita, mancanza di cura parassitologica, tossicità e spese) richiedono alternative più convenienti e con maggiore efficacia. Il requisito a lungo termine per la somministrazione parenterale e/o il costo elevato possono ridurre il tasso di conformità dei proprietari dei cani durante il trattamento.

La leishmaniosi negli esseri umani e nei cani dovrebbe essere trattata con farmaci che agiscono attraverso meccanismi separati al fine di minimizzare il pericolo di generare ceppi di parassiti resistenti (Baneth e Shaw, 2002). La prognosi e il decorso clinico della leishmaniosi sono variabili e il sistema immunitario dell'ospite gioca un ruolo fondamentale nell'instaurarsi dell'infezione e nell'esito della terapia. L'immunomodulazione aggiunta al trattamento convenzionale potrebbe essere una chiave terapeutica per il successo nel trattamento della malattia (Gomez-Ochoa et al., 2009).

Il domperidone (Molitium o Leishguard), infatti, è un farmaco immunostimolante che viene sempre più utilizzato in medicina veterinaria come agente profilattico o immunoterapico, sia come monoterapia sia in combinazione con farmaci antileishmania.

Il domperidone si è dimostrato essere utile per la gestione dei primi stadi di LCan o per la prevenzione della malattia clinica come parte di un programma di controllo integrato (Cavalera et al., 2021). Tuttavia, i veterinari dovrebbero essere consapevoli della potenziale cardiotoxicità del domperidone se somministrato insieme a farmaci che inibiscono gli enzimi epatici CYP450s o che prolungano l'intervallo QT.

Il domperidone (Figura 31) è un derivato benzimidazolico con un'attività antagonista selettiva del recettore D2 della dopamina. Negli umani, il domperidone è classificato come farmaco iperprolattinemico in quanto provoca il rilascio di serotonina, che a sua volta stimola la produzione di prolattina, e antiemetico, in virtù del blocco dei recettori della dopamina.

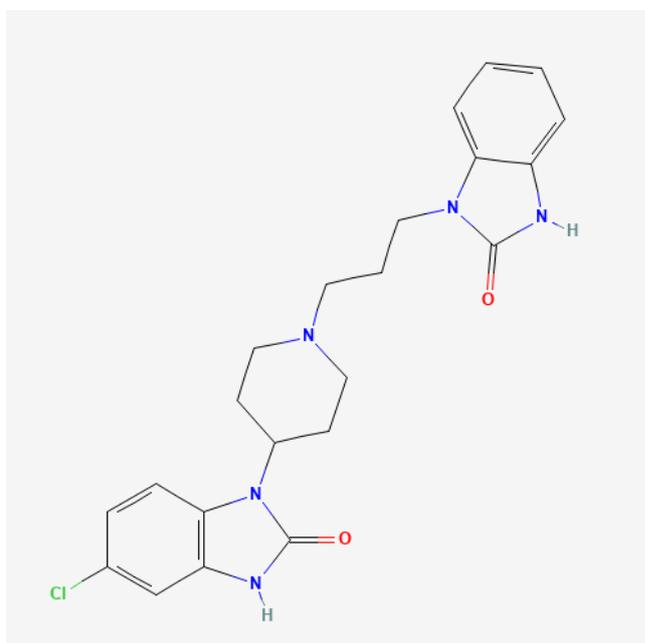


Figura 31. Domperidone, formula di struttura (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3151>)

È stato ben documentato che questo farmaco aumenta significativamente la concentrazione di prolattina nel siero (Reddymasu et al., 2007). In medicina veterinaria, il domperidone potrebbe essere usato come farmaco procinetico gastrico.

La capacità del farmaco di uccidere il flebotomo sembra essere legata allo stato di iperprolattinemia

durante l'allattamento. La prolattina, l'ormone che viene secreto dall'ipofisi e generato dai linfociti, ha un ruolo centrale nella reazione immunitaria, ma il suo meccanismo di azione è in gran parte sconosciuto. L'ormone, la cui funzione principale è quella di stimolare la produzione di latte nei mammiferi, è ora classificato come una citochina proinfiammatoria derivata dai linfociti.

Una stimolazione mediata dalla prolattina dell'immunità Th1 provoca il rilascio di interleuchina (IL)2, IL-12, interferone (INF)- $\gamma$  e fattore di necrosi tumorale (TNF)- $\alpha$ , che porta all'attivazione delle cellule natural killer e dei macrofagi seguita da una diminuzione delle sottopopolazioni CD4 + Th2 e del T F- $\beta$  (Gomez-Ochoa et al., 2009).

È anche un agente periferico specifico antagonista dei recettori per la dopamina (DA2), e l'evidenza suggerisce che il recettore intrarenale DA2 nei cani svolga un ruolo nel controllo della funzione renale. Infatti, la somministrazione del farmaco aumenta la velocità di filtrazione glomerulare, il flusso plasmatico renale e la frazione di filtrazione nei cani, mentre la stimolazione dei recettori renali DA2 diminuisce la funzione renale mediante meccanismi emodinamici (Cavalera et al., 2021).

Diversi studi hanno documentato l'uso del domperidone non solo come misura preventiva ma anche per il trattamento della malattia lieve (Monteiro et al., 2021).

Uno studio clinico su 70 cani naturalmente infetti (Gomez-Ochoa et al., 2009) ha indicato che il domperidone ha migliorato significativamente la condizione clinica degli animali. Il miglioramento clinico è stato osservato nell'86% (24/28) dei cani malati, che è stato accompagnato da livelli di anticorpi stabili nel 57,1% degli animali. Inoltre, a 90 giorni dopo il trattamento, tutti i cani infetti, indipendentemente dalle loro condizioni cliniche iniziali, non mostravano nessun segno clinico di malattia e avevano livelli negativi o titoli anticorpali antileishmania significativamente più bassi.

L'etichetta del domperidone veterinario (Leisguard™) non ne raccomanda l'uso con la cabergolina (agonista della dopamina), dopamina e cimetidina, omeprazolo o farmaci simili. Tuttavia, non sono stati effettuati studi per valutare le sue interazioni con altri farmaci. Tra gli effetti collaterali, ricordiamo poliuria, disoressia, vomito e diarrea.

Il programma di trattamento per cani raccomandato dal produttore del prodotto veterinario è di 0,5 mg/kg/giorno per 30 giorni ogni tre mesi, che è un regime a basso dosaggio con pochi effetti collaterali.

La letteratura della medicina umana ha indicato che alcune precauzioni devono essere prese quando si usa il farmaco. Uno studio caso-controllo ha confermato il rischio più elevato di morte cardiaca improvvisa (95%) quando si assumono alte dosi di domperidone, ad esempio > 30 mg/giorno (> 0,4-0,5 mg/kg/giorno). Mentre la dose raccomandata nei cani rientra nell'intervallo di sicurezza, è importante considerare due diverse situazioni che possono portare ad aritmie pericolose per la vita.

Il domperidone è noto per prolungare l'intervallo QT e questo effetto indesiderato potrebbe essere sinergizzato se altri farmaci con un effetto collaterale simile sono co-somministrati all'animale.

Un'altra circostanza in cui la concentrazione di domperidone potrebbe aumentare inavvertitamente è quando i cani ricevono contemporaneamente farmaci che hanno una forte attività inibitoria del citocromo.

Ha bassa biodisponibilità quando viene somministrato per via orale, ma il suo assorbimento aumenta in presenza di inibitori del CYP3A1 e inibitori della P-gp. Il domperidone è principalmente metabolizzato dal CYP3A4 (CYP3A12 e CYP3A26 sono gli ortologi canini) e l'interazione con farmaci che inibiscono questo enzima di detossificazione può aumentare la concentrazione di domperidone esponendo l'animale a livelli cardiotossici (prolungamento del QT). Ketoconazolo, itraconazolo ed eritromicina sono esempi di farmaci veterinari che inibiscono CYP450, e quindi dovrebbero essere evitati quando cani sono sotto trattamento con domperidone. Altri farmaci con simile capacità inibitoria del CYP450 sono la cimetidina, fluorochinoloni, cloramfenicolo e fenobarbital.

Prima dell'implementazione del domperidone, un'ulteriore attenzione va posta a condizioni quali l'età, la razza e lo stato ormonale dell'animale. Queste variabili sono state associate a una diversa capacità di disintossicazione degli enzimi epatici. Inoltre, lo stato cardiologico, principalmente nei cani più vecchi o nelle razze inclini a soffrire di condizioni cardiache (es. boxer) deve essere considerato.

Un'attenta valutazione dei rischi di effetti collaterali legati a età, razza, interazioni farmacologiche, endocrinopatie concomitanti e all'idoneità cardiaca dei cani dovrebbe precedere la somministrazione di domperidone. I veterinari potrebbero dare un contributo essenziale alla farmacovigilanza, a condizione che riferiscano coerentemente alle agenzie farmaceutiche locali tutti gli effetti collaterali osservati durante la loro pratica clinica.

Poiché il domperidone agisce come un immunostimolante con attività diretta non nota contro il parassita, il suo utilizzo non comporterebbe il rischio che *L. infantum* sviluppi resistenza al farmaco. In Europa, ai proprietari di cani viene raccomandato di usare il prodotto veterinario, che è convenientemente formulato per la somministrazione agli animali (~15€/trattamento) (Travi e Mirò, 2018).

I vantaggi del domperidone sono, appunto, il basso costo e la somministrazione orale. Effetti centrali sono stati riportati in rare occasioni, ma non sono generalmente attesi poiché la barriera emato-encefalica non è attraversata dal farmaco. Il domperidone è stato efficace nel controllare e ridurre i segni clinici della leishmaniosi nei cani e il titolo anticorpale (Gomez-Ochoa et al., 2009).

## Azoli

La somministrazione iniettabile costituisce il problema principale dei trattamenti, dal momento che richiede ai pazienti di recarsi in centri sanitari, l'ospedalizzazione e la

somministrazione, condizioni che non si adattano alla realtà delle condizioni di povertà dei pazienti affetti dalla malattia. In questo contesto, lo sviluppo di una medicina orale è diventato un punto focale in quanto può risolvere molti di questi problemi (de Souza et al., 2020).

Come già detto in precedenza, l'unico farmaco orale disponibile per la leishmaniosi è la miltefosina, che è stata approvata per questo scopo dalla Food and Drug Administration (FDA) nel 2014, e rappresenta un importante progresso terapeutico. Tuttavia, ha anche delle limitazioni, tra cui il costo elevato, la necessità di monitorare gli effetti collaterali gastrointestinali, l'epatotossicità, la teratogenicità e l'emergere di resistenza, il che rende il suo uso difficoltoso nella maggior parte dei paesi colpiti (Ghorbani et Farhoudi, 2020)

Inoltre, tale medicina non è registrata per l'uso umano in alcuni paesi endemici, come è il caso del Brasile, in cui oggi è registrato solo per uso veterinario.

Oltre alla miltefosina, altri farmaci molto importanti somministrati oralmente appartengono alla classe degli azoli. Come per l'amfotericina B, alcuni antifungini azolici inibiscono la 14 α-demetilazione del lanosterolo, mediata dal citocromo P450. Essi causano un accumulo di 14 α-metil steroli e bloccano la sintesi dell'ergosterolo dei parassiti della *Leishmania*.

I 5-nitroimidazoli rappresentano una classe di composti (del gruppo ketoconazolo) dotata di attività antibatterica e antiprotozoaria. L'esatto meccanismo di azione del metronidazolo non è completamente chiarito ma, sembrerebbe che il composto una volta penetrato nell'organismo sensibile, impedisca l'avvolgimento della doppia elica del DNA batterico mediante l'inibizione della DNA girasi (Manna et al., 2006).

Metronidazolo e gli inibitori della biosintesi degli steroli (ketoconazolo, fluconazolo, itraconazolo e terbinafina) sono farmaci ben tollerati che sono potenzialmente attivi contro *Leishmania* se somministrati per bocca.

Il ketoconazolo (600 mg/d negli adulti e 10 mg/kg/d nei bambini, per un mese) è stato provato negli anni 1980. La sua efficacia varia a seconda della specie e questo farmaco non è usato comunemente.

Il fluconazolo ha una lunga emivita, un'alta solubilità in acqua e una concentrazione nella pelle che è dieci volte quella del plasma. Il tempo di guarigione risulta essere anche significativamente più breve nel gruppo del fluconazolo (mediana di 8,5 settimane). L'itraconazolo (100-400 mg/d) è stato usato con una certa efficacia, in India, Brasile, Argentina, Italia o Regno Unito (Minodier e Parola, 2007).

## Enrofloxacin

L'enrofloxacin è un Acido Chinolon-Carbossilico e possiede (unitamente ad altri fluorochinoloni) gruppi funzionali altamente specifici per l'attività antibatterica.

Ad esempio, la presenza in posizione 6 di un atomo di fluoro permette di allargare lo spettro di azione antibatterico sia nei confronti dei germi Gram positivi che Gram negativi, come pure dei micoplasmi e delle clamidie. Inoltre, l'introduzione di un anello piperazinico in posizione 7 ne aumenta significativamente la penetrazione nei tessuti e nei batteri con conseguente incremento dell'attività; l'introduzione di un atomo di ossigeno in posizione 8 ne comporta un

miglioramento delle attività nei confronti dei gram positivi e dei microrganismi anaerobi senza interferire con il profilo battericida. I chinoloni inibiscono l'enzima batterico DNA-girasi (topoisomerasi) che è responsabile del superavvolgimento del DNA. L'inibizione di questo enzima ad opera dei chinoloni comporta un effetto battericida dovuto alla perdita da parte del batterio della capacità di replicazione del DNA (infatti la girasi attiva, effettua un taglio sulla catena del DNA, fondamentale al fine di consentirne la replicazione o la trascrizione) (Goodman e Gilman, 2003). Quando la DNA-girasi viene inibita dai chinoloni, si verifica una riduzione del "superavvolgimento" con conseguente alterazione dell'orientamento spaziale del DNA.

Prove sperimentali sulla sua efficacia nella leishmaniosi canina sono molto scarse, sebbene un recente studio (Bianciardi et al., 2004) abbia dimostrato come la sua somministrazione (20 mg/kg una volta al giorno per 4 settimane), soprattutto in combinazione con metronidazolo, possa portare ad una completa remissione dei segni clinici nei cani trattati (il 50% dei cani trattati con sola enrofloxacin e il 75% di quelli trattati con enrofloxacin + metronidazolo). Gli stessi autori, comunque, ritengono che i risultati ottenuti non siano tali da raccomandare l'uso dell'enrofloxacin (anche in combinazione con metronidazolo) per il trattamento dei cani affetti da leishmaniosi, se non nei casi in cui siano presenti anche infezioni secondarie (soprattutto a livello delle lesioni cutanee) da parte di batteri suscettibili alla molecola.

## Azitromicina

L'azitromicina è un antibiotico azalide (famiglia dei macrolidi). Si concentra nei tessuti, soprattutto nei macrofagi che sono infettati dai parassiti della Leishmania, e può raggiungere livelli 100-200 volte superiori a quelli del siero. La sua somministrazione orale, la sua lunga emivita e la sua sicurezza nei bambini sono vantaggi per il trattamento della leishmaniosi. L'azitromicina è efficace per diminuire i promastigoti di L. nella coltura senza cellule e il conteggio degli amastigoti di L. nei macrofagi. Inoltre, ha dimostrato di essere efficace in topi suscettibili infettati da L. (Krolewiecki et al., 2002).

## Trattamento contro la Leishmaniosi cutanea

Le raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) per il trattamento della leishmaniosi cutanea sono antimoniali sistemici o intralesionali, in base alla specie e alle caratteristiche cliniche. La somministrazione locale di antimONIO pentavalente viene usata nella leishmaniosi cutanea localizzata del Vecchio Mondo.

L'OMS raccomanda un'iniezione di 1-3 ml sotto i bordi della lesione e l'intera lesione, fino a quando la superficie si sia imbiancata. L'infiltrazione potrebbe essere fatta ogni 5-7 giorni, per un totale di 2-5 volte. La meglumina antimonioata intra-lesionale (1 ml/cm<sup>2</sup>/settimana, fino

alla guarigione) viene usata anche nei bambini con meno di cinque lesioni, e/o senza lesione su un'area cartilaginea (orecchio, naso). Il dolore durante l'iniezione è riportato frequentemente dai bambini.

Gli eventi avversi osservati maggiormente sono: superinfezioni batteriche (specialmente quando la leishmaniosi cutanea è localizzata sul viso o sugli arti), segni di stibio-intolleranza (in sedi cefaliche) o evoluzione di lesioni (Minodier et Parola, 2007).

La paromomicina, appartenente alla famiglia degli aminoglicosidi, viene in genere utilizzata nel caso di amebiasi, elmintiasi intestinale o leishmaniosi viscerale. Due preparazioni topiche sono disponibili per la leishmaniosi cutanea: 15% di solfato di paromomicina sciolto in una base di paraffina bianca, sia con il 12% di metil-benzene cloruro o con il 10% di urea.

Nella leishmaniosi cutanea da *L. major*, l'efficacia di due applicazioni di unguento al giorno per 10-30 giorni varia dal 74% all'86%, ed è maggiore con applicazioni ripetute (Moosavi et al., 2005).

Imiquimod (Aldara®) viene usato nelle malattie della pelle indotte da HPV, verruche genitali o condizioni premaligne. Questa imidazochinolina è un modificatore della risposta immunitaria che si rivolge preferenzialmente ai monociti e i macrofagi, e induce una risposta T-helper1 con un crescente rilascio di Interferone- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleuchine IL-

1b, IL-6 o IL-8. In un test di infezione in vitro e in topi infetti, l'imiquimod ha dimostrato un'attività leishmanicida inducendo l'espressione della sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS) e il rilascio di ossido nitrico.

È stato usato per la prima volta in combinazione con l'antimonio per la leishmaniosi cutanea: l'associazione di una crema a base di imiquimod 5% (applicazione di un sottile strato di crema ogni due giorni per 20 giorni) e meglumina antimoniato (20 mg/kg/d per 20 giorni) ha curato pazienti più rapidamente rispetto alla meglumina antimoniato. Le cicatrici residue sembravano meno evidenti con il trattamento di imiquimod (Minodier et Parola, 2006).

La crioterapia viene usata solo nella leishmaniosi cutanea del Vecchio Mondo. In uno studio (Panagiotopoulos et al., 2005), si è potuto riscontrare che in seguito al trattamento è stata notata un'ipopigmentazione nel 68%, ma la ripigmentazione si è verificata entro 2-3 mesi. La durata ottimale di ogni applicazione e gli intervalli tra cicli di applicazioni non sono definiti. Si evince pertanto che la crioterapia da sola non porta a grandi risultati (Minodier et Parola, 2007).

# VACCINI

La somministrazione di formulazioni insetticide/repellenti, specialmente come spot on o collari impregnati, è stata ampiamente riconosciuta come il metodo più efficace e raccomandato per prevenire l'infezione da *Leishmania*. Tuttavia, per massimizzare la prevenzione, un approccio multimodale che coinvolge la vaccinazione in associazione con insetticidi/repellenti è raccomandato nei cani sieronegativi (Monteiro et al., 2021), poiché non esiste un vaccino che fornisca il 100% di efficacia (Montoya et al., 2021).

Molte malattie infettive che originariamente minacciavano l'esistenza dell'umanità, come il vaiolo e la poliomielite, sono state efficacemente controllate o addirittura spazzate via dallo sviluppo di vaccini efficaci. I vaccini funzionano generando cellule di memoria a lunga durata negli individui vaccinati che sono in grado di riconoscere rapidamente, rispondere ed eliminare l'organismo invasore nei successivi incontri.

Lo sviluppo di vaccini efficaci contro sia la LCan sia la leishmaniosi umana è stato un obiettivo per la comunità scientifica (Velez et al., 2020). Non esiste, purtroppo, attualmente nessun vaccino clinicamente efficace contro la leishmaniosi umana perché non abbiamo ancora compreso appieno i fattori che regolano lo sviluppo della memoria specifica di *Leishmania* e dell'immunità protettiva.

Attualmente, non è noto come le cellule di memoria siano generate, mantenute e perse dopo l'infezione da *Leishmania*. Tuttavia, è generalmente accettato che il mantenimento di immunità di lunga durata dipende dalla persistenza di parassiti vivi nel sito primario dell'infezione. L'incapacità di eliminare completamente i parassiti dopo la risoluzione della malattia può avere enormi implicazioni nel mantenimento della malattia in aree endemiche così come nei casi di immunosoppressione (come può essere visto durante la coinfezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV)).

È stato dimostrato che è possibile generare un'immunità relativamente duratura in assenza di parassiti vivi e replicanti. Tuttavia, sono necessari studi per determinare modi per mantenere le cellule di memoria di *Leishmania* generate in vivo da tale immunizzazione ripetuta con parassiti uccisi (Okwor et Uzonna, 2016).

Nei cani sono stati testati diverse tipologie di vaccino:

- vaccini inattivati;
- vaccini ad antigeni purificati;
- vaccini ad antigeni ricombinanti;
- vaccini a DNA.

I vaccini basati su antigeni ricombinanti o sui loro prodotti di escrezione-secrezione hanno finora fornito i migliori risultati (Mirò et al., 2018). Per esempio, un vaccino basato su antigeni escretori-secretori di *L. infantum* con Quillaja saponaria come adiuvante (LiESP-QA-21), è stato autorizzato in Europa (CaniLeish, Virbac Animal Health). Dopo un percorso primario che consiste in tre iniezioni a intervalli di 21 giorni, questo vaccino induce una risposta immunitaria mediata da cellule Th1 per un anno contro *L. infantum*, proteggendo i cani dallo sviluppo di

segni clinici dopo l'infezione. Lo studio condotto sui cani da Oliva et al. (2014) ha mostrato un'efficacia nel prevenire l'infezione attiva del 68,4% e una protezione contro lo sviluppo di segni clinici del 92,7%. Poiché nessuno dei vaccini attualmente disponibili è in grado di proteggere completamente contro l'infezione, il loro uso deve essere considerato come parte di un programma di controllo integrato per LCan e non può sostituire le misure antivettoriali (Brianti et al., 2016).

Molti antigeni di *Leishmania* sono stati identificati come potenziali candidati vaccinali, tuttavia, molto pochi sono stati testati in prove sul campo e solo tre vaccini canini di seconda generazione sono stati registrati (Palatnik-de-Sousa, 2012). Il vaccino Fucose mannosio ligand (FML)-saponina (Leishmune®) è stato autorizzato in Brasile nel 2003 e un secondo vaccino, Leish-Tec®, un gene ricombinante A2-antigene di *Leishmania* adiuvato da saponina, è stato anche autorizzato dal 2008. All'inizio del 2011, CaniLeish®, una formulazione legata al surnatante di coltura di *L. infantum* (LiESAp) è stato il primo vaccino per LCan autorizzato per l'uso in Europa. La vaccinazione è progettata per indurre una forte risposta immunitaria cellulare protettiva contro gli antigeni specifici di *L. infantum*, con una risposta immunitaria efficace montata circa 4 settimane dopo la vaccinazione finale (Wylie et al., 2014).

Questi vaccini forniscono almeno 12 mesi di protezione con la chiara indicazione (accettata dalle rispettive agenzie) per ridurre il rischio di sviluppare un'infezione attiva e malattia clinica dopo il contatto con *L. infantum*. Pertanto, per ottenere protezione massima, dato che l'efficacia dei vaccini disponibili non raggiunge il 70% e non evita l'infezione, questi dovrebbero essere sempre utilizzati in combinazione con l'uso di insetticidi/repellenti contro il flebotomo (Mirò et al., 2018).

## Immunologia

Nelle aree endemiche, i cani possono presentare una grave malattia con segni viscerocutanei polimorfi cronici che si manifestano dopo sette mesi dall'esposizione oppure possono rimanere subclinicamente infetti per anni o per tutta la vita. La risposta immunitaria protettiva alla *Leishmania* è cellulo-mediata. L'attivazione del sistema immunitario adattativo nei cani naturalmente resistenti è rivelata dalla linfoproliferazione parassita-specifica, dall'ipersensibilità di tipo ritardato, dalla produzione di citochine dell'interferone e del fattore di necrosi tumorale e da una maggiore attività leishmanicida dei macrofagi attraverso l'ossido nitrico (Gradoni et al., 2015).

Pertanto, un vaccino per la LCan dovrebbe indurre una forte e duratura immunità cellulare dominata da Th1 per controllare la progressione dell'infezione, riducendo contemporaneamente il carico di parassiti nei cani per diminuire la loro infettività per i flebotomi. Inoltre, dovrebbe essere ugualmente efficace nel proteggere contro l'infezione o la malattia (Velez et al., 2020).

La ricerca preclinica in modelli di roditori ha valutato l'efficacia di diverse categorie di antigeni di *Leishmania*, tra cui parassiti uccisi, frazioni purificate dalle cellule, componenti o subunità proteiche del parassita, proteine chimeriche ricombinanti singole o multiple, DNA plasmidico e particelle virali che codificano i fattori di virulenza del parassita. Le promettenti combinazioni antigene/adiuvante di ciascuna delle categorie sopra elencate sono state testate anche nei

cani; nella maggior parte dei casi hanno prodotto una protezione limitata o nulla negli studi di Fase I-II (progettati per testare la sicurezza del vaccino, l'immunogenicità e la protezione indotta dal laboratorio) in cui i cani vaccinati sono stati sfidati dall'iniezione artificiale endovenosa di promastigoti di *L. infantum* ad alto carico. L'antigene ricombinante A2 e la saponina hanno conferito circa il 40% di protezione contro l'infezione con questo sistema di sfida ed è stato registrato in Brasile come vaccino canino (LeishTec®).

Ulteriori studi eseguiti in seguito hanno valutato diverse categorie di antigeni e adiuvanti, ma la maggior parte non ha portato a buoni risultati. Solo due vaccini, che consistono in frazioni purificate dal parassita con adiuvanti derivati dalla saponina, hanno mostrato di conferire una protezione significativa contro la malattia e la morte in condizioni naturali, e sono stati registrati come vaccini canini: FML-QuilA (Leishmune®) in Brasile e LiESP/QA-21 (CaniLeish®) in Europa (Gradoni, 2015).

Il controllo immunitario di *L. infantum* richiede un equilibrio tra risposte infiammatorie e regolatorie. Questo meccanismo è in particolare tra le cellule T CD4+ proinfiammatorie di tipo T helper 1 (Th1) che sono responsabili del controllo della replicazione del parassita e le cellule T regolatrici 1 che mediano una risposta immunosoppressiva, regolatoria, necessaria per smorzare l'infiammazione sovrabbondante che, se predominante, porta alla progressione della malattia.

Dopo l'esposizione ai parassiti, i macrofagi dovrebbero attivarsi, eliminando *L. infantum* attraverso il rilascio di specie reattive dell'ossigeno. Sfortunatamente, molteplici fattori del parassita e dell'ospite possono impedire l'attivazione dei macrofagi permettendo ai parassiti di persistere al loro interno. I neutrofili e le cellule Th17 si aggiungono allo stato infiammatorio, aiutando la rimozione del parassita, ma contribuendo anche alla sintomatologia. Una popolazione di cellule B regolatrici aumenta la produzione di IL-10 e regola la risposta Th1 permettendo la crescita del parassita. Tutte queste sfide immunitarie influenzano l'equilibrio tra la progressione verso la malattia clinica e il mantenimento della malattia sub-clinica. I vaccini e le immunoterapie mirate al recupero o al mantenimento della funzione delle cellule T e B possono essere fattori importanti nel ricucire l'equilibrio immunitario necessario per sopravvivere alla CanL (Toepp e Petersen, 2020).

Come per qualsiasi infezione, la risposta immunitaria gioca un ruolo critico nella capacità del cane di combattere la malattia e prevenire la progressione verso gli stadi clinici. I macrofagi e i neutrofili hanno ruoli distinti nella capacità del sistema immunitario di combattere o soccombere alla leishmaniosi. Dopo l'infezione iniziale, i parassiti di *Leishmania* cambiano forma passando dallo stato di promastigote (che viene fagocitata dai macrofagi e da altre cellule fagocitanti) allo stato di amastigoti intracellulari. Gli amastigoti possono moltiplicarsi all'interno della cellula fino a quando la cellula non subisce lisi e rilascia i parassiti nel sangue o in altri spazi interstiziali per infettare altre cellule. In alternativa, il parassita è limitato nella crescita e l'infezione è controllata (Terrazas et al., 2015).

I neutrofili svolgono un ruolo importante nella risposta immunitaria all'infezione da *Leishmania* come cellule innate di primo intervento. Durante la leishmaniosi canina, i neutrofili arrivano per primi al sito di infezione dove la loro interazione con i flebotomi può portare alla

distruzione del parassita e al reclutamento di macrofagi o alla sopravvivenza prolungata del parassita. I neutrofili fagocitano i parassiti di *Leishmania* e questo meccanismo innesca anche il rilascio di TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  che non solo reclutano i macrofagi nei tessuti infetti, ma sono coinvolti anche nell'attivazione dei macrofagi e nell'uccisione dei flebotomi (Gonçalves et al., 2019). Durante la malattia clinica, *Leishmania* induce l'apoptosi precoce dei neutrofili. I parassiti innescano i neutrofili per rimanere in vita più a lungo, fornendo un meccanismo di "cavallo di Troia" che permette ai parassiti di sopravvivere all'interno del vacuolo parassitoforo, e nei modelli murini di essere assorbiti dai macrofagi senza segnali infiammatori il che porta alla persistenza del parassita.

Anche le cellule Th17 hanno recentemente dimostrato di avere un ruolo infiammatorio durante l'infezione da *Leishmania*. IL-17 rilasciata dalle cellule Th17 ha reclutato neutrofili e macrofagi nel sito di infezione (Goncalves-de-Albuquerque et al., 2017). La trascrizione di IL-17 è ridotta rispetto agli animali non infetti 15 mesi dopo l'infezione nei linfonodi drenanti, dimostrando che potrebbe esserci una regolazione di questa risposta iperinfiammatoria con il progredire della malattia. IL-17 contribuisce ad aumentare la produzione di IFN- $\gamma$  e a ridurre IL-10. Durante la malattia clinica, la produzione continua di IL-17 ha portato a un sovra-reclutamento di neutrofili nei siti infiammatori, che può portare a danni ai tessuti come avviene nelle forme umane di leishmaniosi cutanea e mucocutanea.

Durante la fagocitosi dei macrofagi, il parassita viene inghiottito e sopravvive all'interno del vacuolo, una struttura basata sul fagolisosoma. All'interno del vacuolo parassitario, *Leishmania* manipola i sistemi di risposta dei macrofagi per evitare la distruzione da parte delle specie reattive dell'ossigeno (Toepp et Petersen, 2020).

Il fattore determinante del risultato delle infezioni da LCan è proprio la capacità del sistema immunitario di gestire il parassita in modo efficiente. La risposta protettiva contro la *Leishmania* è l'immunità cellulo-mediata: classicamente, una risposta T helper (Th1) è correlata alla resistenza, mentre una risposta Th2 è associata alla suscettibilità all'infezione, rivelata dall'aumento del carico di parassiti e da una risposta umorale forte ma inefficace (Jain et Jain, 2015). Per le specie di parassiti che causano l'infezione viscerale predominante, come *L. infantum*, una risposta mista con un profilo Th1 dominante è richiesta per la protezione. Le risposte specifiche del parassita che coinvolgono le cellule T CD4+ e CD8+ e la secrezione di citochine, determinano il carattere clinico finale della malattia. Seguendo la deposizione nel derma di promastigoti metaciclici infettivi insieme a componenti salivari e intestinali del vettore, il sistema immunitario innato della pelle coinvolge recettori presenti su neutrofili, macrofagi, cellule dendritiche e cellule killer naturali. I recettori TLR (Toll-like receptors) contribuiscono al riconoscimento innato di *Leishmania* che porta all'attivazione delle risposte infiammatorie e al controllo della proliferazione del parassita. Nei cani infettati da *L. infantum* con un modello di resistenza naturale (cioè una condizione subclinica a lungo termine), l'attivazione del sistema immunitario adattativo si trova associata alla linfoproliferazione parassito-specifica, all'ipersensibilità di tipo ritardato (DTH), alla produzione di citochine macrofagiche attivanti l'interferone e il fattore di necrosi tumorale, e a una maggiore attività leishmanicida dei macrofagi attraverso l'ossido nitrico.

Nei cani che mostrano una moltiplicazione incontrollata del parassita e una disseminazione che porta alla LCan grave, la condizione immunitaria è probabilmente correlata all'inibizione della risposta protettiva Th1 piuttosto che con un evidente pattern Th2 antigene-specifico: bassi livelli di entrambe le citochine Th1/Th2 sono solitamente riportati nei tessuti di cani clinicamente affetti (Gradoni et al., 2015). Pertanto, un vaccino efficace contro la LCan dovrebbe indurre una forte e duratura immunità dominata da Th1 per prevenire l'instaurarsi di un'infezione iniziale o controllare la sua progressione verso la malattia grave. Così facendo, un vaccino efficace promuoverebbe anche la riduzione della trasmissione del parassita, che è noto essere correlata alla progressione della malattia nei cani (Gradoni, 2015).

La segnalazione mediata dai recettori di rilevamento di *Leishmania* nei macrofagi, compresi i recettori toll-like (TLR) e altri recettori di pattern molecolari associati al patogeno, avvia percorsi di segnalazione che downregolano la produzione di IL-12 necessaria per lo sviluppo di una cellula T helper 1 (TH1) CD4+ di tipo 1. La trascrizione dei prodotti genici TLR è stata dimostrata nei cani con diagnosi di leishmaniosi (Montserrat-Sangra et al., 2016). Questo include la trascrizione e la produzione di molteplici citochine infiammatorie, tra cui il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ), e l'interferone gamma, IFN- $\gamma$ . *L. infantum* contrasta questo producendo antiossidanti, tra cui la superossido dismutasi, che smorza gli effetti letali delle specie reattive dell'ossigeno e promuove la crescita del parassita all'interno della cellula.

I TLR espressi sulla superficie di cellule dendritiche, macrofagi e monociti possono portare alla stimolazione o all'inibizione dell'attivazione cellulare e della produzione di IL-12. I macrofagi canini hanno una maggiore espressione di diversi TLR, importanti nel rilevamento dei pattern molecolari associati ai patogeni (PAMPs), tra cui TLR-4. Il legame di TLR-4 ai ligandi del parassita induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno e riduce la crescita del parassita. C'è una significativa riduzione della trascrizione di TLR-4 insieme a diversi altri TLR con il progredire della malattia.

Per limitare o arrestare la sopravvivenza intracellulare dei parassiti, i macrofagi producono IL-12 che promuove una risposta di tipo TH1 (Strauss-Ayali et al., 2005).

Durante una normale risposta TH1, le cellule T CD4+ sono importanti per combattere i patogeni intracellulari producendo IFN- $\gamma$  che attiva i macrofagi. Le cellule T CD4+ TH1 producono anche IL-2, che induce la proliferazione di altre cellule T, che poi fornisce un esercito di cellule TH1 creando un ambiente favorevole per l'uccisione intracellulare di *Leishmania* (Toepp et Petersen, 2020).

Durante la malattia sub-clinica, i cani hanno cellule T CD8+ citotossiche proliferanti, che possono aiutare a controllare *L. infantum* uccidendo i macrofagi infetti. Per prevenire qualsiasi danno negativo da queste citochine proinfiammatorie viene prodotta una piccola quantità di IL-10, spesso appena rilevabile.

Con la progressione della malattia, il sistema immunitario comincia a perdere la sua capacità di mantenere questo delicato equilibrio di infiammazione senza patologia.

La produzione di IL-10 guida la diminuzione della proliferazione delle cellule T CD4+ TH1 protettive in risposta all'antigene del parassita, riducendo il numero di cellule T che producono IFN- $\gamma$  e questo si traduce in una mancanza di attivazione dei macrofagi e quindi in una ridotta uccisione del parassita. Diagnosticamente questo livello di malattia può essere caratterizzato

da risultati positivi alla qPCR così come da valori sierologici elevati (Liu et Uzonna, 2012). C'è anche una transizione verso la produzione di una risposta regolatoria con l'aumento della proliferazione delle cellule T regolatrici e delle citochine regolatrici, in particolare IL-10, che riduce la proliferazione delle cellule T CD4+. La downregulation della risposta TH1 unita all'aumento delle risposte umorali porta all'esaurimento delle cellule T e alla crescita/sopravvivenza del parassita.

Il cambiamento del fenotipo delle cellule T è fondamentale per il passaggio tra la risposta immunitaria infiammatoria iniziale in grado di ridurre il carico del parassita e lo stato di regolamentazione in cui la crescita del parassita è incontrollata (Toepp et Petersen, 2020).

Le cellule B che sviluppano una funzione regolatoria possono portare ad un aumento della malattia sopprimendo le cellule T helper e inducendo la produzione di IL-10. Attivano le cellule T CD4+ e producono anticorpi contro il parassita *Leishmania*. Durante l'infezione, le cellule B presentano l'antigene alle cellule helper TH1 CD4+ che a loro volta attivano le cellule B per produrre anticorpi.

All'inizio della malattia gli anticorpi prodotti dalle cellule B sono specifici per i parassiti della *Leishmania* e sono produttivi nell'indurre l'opsonizzazione, la fagocitosi promossa dagli anticorpi, delle cellule infette, da parte dei macrofagi attivati, e la neutralizzazione dei fattori di virulenza specifici di *Leishmania*. Durante l'infezione sub-clinica questi processi continuano a verificarsi a livelli più bassi permettendo la continua propagazione dei parassiti. Questo è diagnosticamente rilevabile tramite ELISA come basso livello di anticorpi.

Man mano che il parassita continua a propagarsi si verifica un aumento del livello di anticorpi IgG non specifici. Questi anticorpi IgG possono legarsi all'antigene *Leishmania* creando complessi che innescano la produzione di IL-10 da parte dei macrofagi. Questo meccanismo agisce come feedback negativo perché induce i macrofagi a ridurre l'attivazione e prevenire la produzione di specie reattive dell'ossigeno capaci di uccidere i parassiti. Nei cani con malattia clinica, questo è caratterizzato da ipergammaglobulinemia. Inoltre, l'aumento della produzione di anticorpi provoca anche la deposizione di immunocomplessi, all'interno del rene e altrove, costituiti dall'antigene *Leishmania* IgG e dalla proteina del complemento C3 (Toepp et Petersen, 2020). La deposizione di questi complessi porta al danno renale e infine all'insufficienza renale. L'insufficienza renale è una delle cause più comuni di morte tra i cani a causa della leishmaniosi e rimane anche una complicazione frequente tra gli esseri umani con leishmaniosi viscerale (Castagnaro et al., 2007).

Schaut et al. (2016) sono stati in grado di dimostrare che nelle cellule T CD4+ esaurite, quando viene usato un antigene vaccinale, c'è un aumento della proliferazione e della produzione di INF- $\gamma$ . Il recupero è stato migliore nei cani sub-clinici rispetto ai cani con segni clinici della malattia. L'aggiunta degli agonisti TLR ha aumentato significativamente la proliferazione e la produzione di IFN- $\gamma$  nelle cellule T CD4+ esaurite, indipendentemente dallo stato della malattia, mostrando che l'aggiunta degli agonisti era importante per recuperare la funzionalità delle cellule T nei cani con segni clinici della malattia. Questa ricerca suggerisce il potenziale per l'uso di vaccini in cani già infetti come potenziali immunoterapie combinate con

chemioterapie, proprio come è stato suggerito per il trattamento della VL umana (Toepp et Petersen,2020).

Attualmente è disponibile in Europa solo il vaccino Letifend.

Leishmune® è un vaccino a base di fucosio mannosio ligando (FML)-saponina; è stato autorizzato in Brasile nel 2003 per proteggere i cani da *L. donovani*. La sua efficacia contro questo parassita è stata del 76%, con un tasso di protezione del 92%. Il Ministero della Salute brasiliano, tuttavia, non ha adottato Leishmune® come strumento di prevenzione della leishmaniosi nei cani.

Leish-Tec® contiene l'antigene A2 ricombinante di amastigoti di *Leishmania* e utilizza la saponina come adiuvante. È stato autorizzato nel 2008. C'è una carenza di prove per l'efficacia di questo vaccino commerciale.

CaniLeish® (LiESP/QA-21) contiene un surnatante di coltura di promastigoti di *L. infantum* (LiESAp), che consiste in una proteina di 54 kilodalton (kDa) escretata da *L. infantum*, con muramyl dipeptide (MDP). L'efficacia di questo vaccino contro *L. infantum* è stata del 68,4%, con un tasso di protezione del 92,7%. Dopo l'esposizione all'infezione naturale da *L. infantum*, la probabilità che i cani vaccinati diventassero positivi alla PCR era simile a quella dei cani in un gruppo di controllo, ma, tra i cani PCR positivi, la probabilità di ritornare ad uno stato PCR negativo era più alta nel gruppo vaccinato che nel gruppo di animali di controllo (Gharbi et al., 2015)

I vaccini di prima generazione (come Leishmune e CaniLeish) hanno dimostrato una robusta immunità protettiva nei cani (Moafi et al., 2019)-

I vaccini animali come Leishmune, CaniLeish, e Leish-Tec potrebbero essere raccomandati come appropriate scelte per il controllo e la prevenzione della leishmaniosi. Inoltre, i vaccini di seconda generazione come LEISH-F2 potrebbero essere adottati come un approccio promettente per la prevenzione della leishmaniosi umana. Recentemente, i vaccini vivi attenuati e vaccini a DNA hanno indotto un'appropriata risposta immunitaria contro *L. infantum* e *L. donovani*, rispettivamente. Di conseguenza, questi vaccini potrebbero essere considerati come approcci promettenti per la prevenzione delle infezioni da *Leishmania* (Moafi et al., 2019).

I vaccini sono preparati che migliorano l'immunità a una specifica malattia a scopo profilattico, prevenendo o migliorando così gli effetti di future infezioni da patogeni selvatici. Quindi, il fatto che i vaccini contro il CanL non proteggano contro l'infezione per cui sono stati realizzati rappresenta un importante problema di efficacia che deve essere adeguatamente studiato (Calzetta et al., 2020).

Infatti, gli autori hanno dichiarato che sebbene i vaccini attualmente commercializzati nell'UE possano ridurre la progressione della malattia e la probabilità di sviluppare segni clinici, questi vaccini non prevenivano l'infezione (Calzetta et al., 2020).

## Leishmune

Il Brasile è diventato il primo paese al mondo ad offrire vaccini commercialmente disponibili per immunizzare cani contro *L. infantum*. Nel 2003, il vaccino Leishmune, originariamente commercializzato da FortDodge Animal Health e successivamente da Zoetis, è stato autorizzato per la prevenzione della LCan dal Ministero dell'agricoltura, dell'allevamento e dell'approvvigionamento alimentare brasiliano (MAPA).

Data l'importanza della diagnosi della sieropositività nella pratica veterinaria e nella sorveglianza epidemiologica, i vaccini LCan non dovrebbero in genere indurre anticorpi rilevabili dai test sierologici utilizzati per la diagnosi dell'infezione (Solano-Gallego et al., 2017).

Il vaccino Leishmune ha già dimostrato la sua efficacia in vari studi sul campo (Nogueira et al., 2005; Saraiva et al., 2006). Si tratta di un vaccino FML-saponina che protegge il 98% dei cani vaccinati, bloccando la trasmissione della malattia del flebotomo ai vettori. Questo strumento agisce su un momento cruciale del ciclo di vita di *Leishmania infantum*, con importanti effetti epidemiologici: infatti, è stato dimostrato che i cani vaccinati non presentano il parassita nel sangue, pelle e nei linfonodi, e quindi non espongono il parassita al flebotomo.

La vaccinazione è discussa a causa dei possibili effetti sulla risposta sierologica dei cani sani vaccinati: i cani in seguito alla vaccinazione potrebbero presentare una sieroconversione, quindi essere indistinguibili dai cani infetti (Marcondes et al., 2011). Questo vaccino ha anche dimostrato la sua efficacia come agente immunoterapico, usato da solo o in associazione con allopurinolo e amfotericina B (chemioimmunoterapia) per il trattamento di cani sintomatici. In particolare, la combinazione chemioterapia-vaccino (chemioimmunoterapia) è risultata molto efficace per eliminare anche le infezioni latenti, dato che l'80% dei pazienti hanno mostrato linfonodi negativi alla PCR dopo otto mesi di trattamento, contro solo il 33% dei pazienti con l'immunoterapia da sola (Vulpiani et al., 2011).

Questo vaccino consiste in un antigene fucosio-mannoso (FML) purificato da *L. donovani* e mescolato con saponina QuilA come adiuvante. FML è una miscela di glicoproteine e il glicocongiugato di superficie GP36 è il principale componente immunogenico (Gradoni, 2015).

## LeishTec

Nel 2007, il MAPA ha autorizzato l'uso del vaccino Leish-Tec1 (Hertape Calier Saúde Animal, Brasile), che è attualmente l'unico vaccino commerciale disponibile contro la LCan in Brasile. Leish-Tec è stato segnalato per indurre risposte anticorpali rilevabili con il metodo ELISA. In uno studio (Fernandes et al., 2014) è stato dimostrato che Leish-Tec ha indotto la conversione nel 30,9% degli animali vaccinati, come riscontrato dal test ELISA, con i livelli di IgG che si alzano nel 21° giorno dopo la seconda dose di questo vaccino. Inoltre, un esperimento

comparato ha mostrato che non ci sono differenze significative per quanto riguarda l'IgG sieropositività dei cani vaccinati con Leishmune o Leish-Tec ed esposti all'infezione per undici mesi in un'area endemica per la leishmaniosi.

Di fatto, finora, distinguere con altri metodi sierologici i cani vaccinati da quelli naturalmente infetti non si è dimostrato affidabile (Solano-Gallego et al., 2017).

"Differenziare tra animali infetti e vaccinati" è un concetto ben noto in vaccinologia veterinaria (Solano-Gallego et al., 2017). Questa differenziazione può essere ottenuta attraverso la non interferenza con le tecniche sierologiche standard o attraverso lo sviluppo di test diagnostici specifici, che dovrebbero presentare alta specificità e sensibilità. L'impossibilità di distinguere tra cani vaccinati e cani naturalmente infetti può introdurre notevoli restrizioni alla diagnosi e sorveglianza dell'infezione, specialmente nelle aree endemiche. La diversità dei possibili esiti dell'infezione e l'alta proporzione di animali infetti asintomatici rendono la leishmaniosi una sfida diagnostica che spesso richiede l'uso di più metodi diagnostici (Velez et al., 2020).

## Canileish

Nel 2011 Canileish (Figura 32) (Virbac, Francia) è stato autorizzato in Europa per protezione dei cani contro l'infezione da *L. infantum*, ma ora non è più commercializzato. Richiedeva una dose annuale e diminuiva, piuttosto che eliminare, il rischio che il cane acquisisca la leishmaniosi. (Pace, 2014).



Figura 32. Canileish®, vaccino contro la leishmaniosi canina (<https://leish.info/canileish-impfung-mit-risiko/>)

Il vaccino consiste in proteine purificate escrete/secrete (ESP) da *L. infantum* (LiESP) e dell'adiuvante QA-21, una frazione altamente purificata di saponina (*Quillaria saponaria*). La risposta immunitaria indotta da questo vaccino contro il flebotomo è una risposta cellul-

mediata dominata da Th1. Il vaccino inoltre suscita la produzione di anticorpi specifici (IgG1 e IgG2) con un profilo predominante IgG2 che può essere rilevato da test quantitativi convenzionali (IFAT ed ELISA) (Solano-Gallego et al. 2017). Può essere prescritto solo in cani sani sieronegativi di età superiore ai 6 mesi. La prima vaccinazione consiste in tre iniezioni date a 21 giorni di distanza l'una dall'altra. Nei cani vaccinati, l'immunità è raggiunta 1 mese dopo l'ultima iniezione e la durata dell'immunità è di 1 anno. CaniLeish® ha dimostrato una moderata efficacia in prove di laboratorio e sul campo (Oliva et al. 2014). I cani sono stati prima vaccinati con tre dosi di LiESP/QA-21 (CaniLeish®), ciascuna dose somministrata per via sottocutanea ogni 21 giorni. Le dosi di richiamo di LiESP/QA-21 sono state somministrate ai cani vaccinati 1 anno dopo la vaccinazione precedente e ogni anno successivo nello studio di rivaccinazione. Le iniezioni sono state somministrate dal veterinario nella zona dell'interscapola seguendo le raccomandazioni del produttore.

I segni clinici riscontrati entro 30 minuti dalla vaccinazione sono comunemente: reazioni anafilattiche, eritema e angioedema facciale, gonfiore, edema e/o dolore al sito di iniezione. Altre possibili reazioni avverse sono state osservate nelle ore o nei giorni successivi alla vaccinazione e riportate dai proprietari: apatia, disturbi digestivi (vomito e/o diarrea), incontinenza urinaria o fecale e gonfiore, edema e/o dolore al sito di iniezione.

Finora, una relazione tra eventi avversi e caratteristiche del cane (es. sito di iniezione, dimensioni, e razza) non è stata rilevata; quindi, queste risposte sono probabilmente dovute all'infiammazione legata all'adiuvante saponina o a qualsiasi altro componente del vaccino (Toepp et al. 2018).

Possono essere rilevate risposte anticorpali simili in cani dopo la prima vaccinazione o la vaccinazione di richiamo, anche se i titoli di IgG erano più alti dopo il richiamo. Il rilevamento di anticorpi anti-*L. infantum* (titoli bassi) tramite IFAT anche 12 mesi dopo la vaccinazione indica che gli attuali test sierologici non sono in grado di discriminare tra i cani vaccinati e quelli infetti e che sono necessari ulteriori test diagnostici molecolari (Montoya et al., 2021). Certamente i segni clinici della CanL sono legati ad una produzione anormale di anticorpi, e l'immunità cellulo-mediata rappresenta il meccanismo primario di resistenza a *L. infantum*. Tuttavia, ci sono prove che suggeriscono che i meccanismi umorali, compresa un'adeguata risposta anticorpale, possono costituire un elemento indispensabile per un'efficace risposta protettiva a LCan. Infatti, poiché sia i Th1 umorali che le risposte delle cellule T citotossiche CD8+ sono necessari per conferire protezione, la co-somministrazione di antigeni del parassita con un adiuvante può aiutare a sostenere e mantenere livelli appropriati di stimolazione antigenica specifica e modulare una risposta Th1/Th2 benefica. A questo proposito, è stato riportato che un corretto equilibrio tra le citochine Th1 e Th2 è fondamentale nel determinare l'esito della leishmaniosi (Calzetta et al., 2020).

Le reazioni avverse dei vaccini sopracitati sono state rilevate in una vasta maggioranza degli utilizzatori del vaccino, le più frequenti sono reazioni locali, apatia, febbre e gastroenterite. La maggior parte dei clinici (82% degli applicatori del vaccino) ha osservato reazioni avverse, talune più gravi, come sincope vaso-vagale, shock anafilattico e persino la morte, sono state riportate, anche se con un'incidenza molto bassa (Lladro et al., 2017).

## Letifend

Il vaccino disponibile in commercio oggi è il Letifend (Figura ). Il vaccino contenente la proteina Q non prevede adiuvanti e si somministra in singola inoculazione con richiamo annuale. Come nel caso del vaccino CaniLeish, anche qui sono previste le stesse indicazioni riguardanti età e sieronegatività (Traversa et al., 2018).



Figura 33. Vaccino LetiFend (Traversa et al., 2018)

I vaccini non prevencono l'infezione ma agiscono limitando la comparsa della malattia e l'eventuale gravità clinica. Pertanto, cani vaccinati e clinicamente sani possono comunque infettarsi e fungere da fonte di infezione per i flebotomi. Il vaccino contenente le proteine purificate e QA-21 (CaniLeish) è comunque in grado di ridurre l'infettività dell'animale nei confronti dei vettori (Bongiorno et al 2013), nonostante il ruolo della popolazione canina vaccinata nell'epidemiologia della leishmaniosi e nei patterns di trasmissione del parassita non sia ben chiaro (Mirò et al 2017). Per questo motivo, è fondamentale che tutti i cani che vivono in zona endemica, inclusi i cani sieropositivi clinicamente sani, i cani malati che ricevono la terapia e anche i cani vaccinati, siano sottoposti alla profilassi vettoriale con i piretroidi.

Allo stato attuale, risulta difficile discriminare con assoluta certezza cani sieropositivi vaccinati con il vaccino contenente proteine e QA-21 dai cani sieropositivi con infezione naturale. Poiché la sieropositività dei soggetti vaccinati non è sufficiente a provare un'infezione in atto, per un'eventuale conferma si deve sempre procedere all'evidenziazione diretta del parassita tramite citologia o PCR, insieme alla valutazione clinica dell'animale. Di contro, sembra che il vaccino contenente la proteina Q (Letifend) non interferisca con gli anticorpi rilevabili con la maggior parte dei test sierologici qualitativi e quantitativi (Traversa et al., 2018).

## Problematiche

Nonostante i progressi nella genomica e nella proteomica di *Leishmania*, la moderna biotecnologia per l'espressione dell'antigene, la purificazione e il rilascio, e la grande disponibilità di modelli murini nel campo dell'immunologia sperimentale soffre ancora di diversi impedimenti che limitano il progresso verso vaccini efficaci e universali. Tra questi, la grande diversità genetica dei parassiti, la difficoltà di identificare marcatori surrogati di resistenza in ospiti naturalmente immunizzati e la mancanza di sistemi pratici di challenge infettivo che imitano quella naturale. La ricerca nei vaccini canini è ulteriormente ostacolata dalla natura polimorfica dell'infezione (modelli "resistenti" contro "suscettibili") e dal decorso clinico cronico della malattia. Questo implica costi molto alti per le indagini sui vaccini: da un lato, è necessario un numero elevato di cani da studio, poiché molti di loro, in modo del tutto imprevedibile, resisteranno naturalmente all'infezione e quindi saranno "inutili" per l'analisi dei dati; dall'altro, ci vogliono anni prima che le valutazioni sull'efficacia clinica possano essere ragionevolmente concluse. Entrambi questi aspetti sono in conflitto con le regole internazionali per il benessere degli animali, rendendo difficile l'approvazione di protocolli a lungo termine che includono numerosi cani che richiedono esami periodici con tecniche invasive come gli aspirati di tessuto. Gli unici studi sul campo che hanno portato a vaccini canini disponibili in commercio hanno arruolato meno di cento cani ciascuno e, poiché i vaccini hanno conferito solo una protezione parziale, i parametri di efficacia erano vicini alla soglia di significatività. I dati post-commercializzazione sull'efficacia del vaccino e il suo impatto sulla trasmissione dei parassiti sarebbero quindi necessari da un numero molto più elevato di cani della "vita reale" (Gradoni, 2015).

Un aspetto importante dello sviluppo del vaccino è la formulazione e la consegna. Gli studi hanno dimostrato che l'incapsulamento di antigeni in liposomi, nanoparticelle o inclusione di adiuvanti migliora notevolmente la loro immunogenicità e capacità protettiva, sottolineando così la necessità di studi continui per migliorare la somministrazione del vaccino. Lo sviluppo di un vaccino efficace andrà a beneficio di circa 350 milioni di persone che sono a rischio di sviluppare la malattia in tutto il mondo.

Inoltre, diversi casi di leishmaniosi sono stati riportati in persone che hanno viaggiato in aree endemiche per affari o per piacere. Un efficace vaccino contro la leishmania potrebbe essere aggiunto alla lista dei vaccini per le persone che vivono in aree non endemiche e che desiderano viaggiare nelle regioni del mondo in cui la *Leishmania* è endemica. Inoltre, in assenza di vaccini, trattamenti profilattici potrebbero aiutare a prevenire l'infezione durante viaggi a breve termine in regioni endemiche (Okwor et Uzonna, 2016).

Purtroppo, la leishmaniosi rimane in gran parte una malattia dei paesi in via di sviluppo e la mancanza di un mercato redditizio rende gli investimenti nella ricerca per sviluppare un vaccino efficace per la protezione umana, poco attraente (Pace, 2014).

# CONCLUSIONE

La leishmaniosi canina è una malattia grave e potenzialmente letale dei cani ed è considerata una delle più importanti zoonosi trasmesse da vettori in Europa, dove è dimostrato che attualmente si sta diffondendo in aree precedentemente non colpite (McGwire et Satoskar, 2013). La gravità di questa malattia varia da lesioni cutanee e deturpazioni ad infezioni sistemiche fatali. L'OMS ha classificato la leishmaniosi come malattia emergente e non controllata, e stima che l'infezione provochi due milioni di nuovi casi all'anno. Attualmente sono 12 milioni le persone infette nel mondo e la leishmaniosi minaccia 350 milioni di persone in 88 Paesi.

Gli agenti patogeni trasmessi all'uomo dai flebotomi sono trascurati, in quanto causano malattie infettive che non rientrano nell'elenco delle priorità dei sistemi di sanità pubblica nazionali e internazionali. Tuttavia, come si diceva, queste infezioni stanno emergendo nella regione mediterranea e probabilmente si diffonderanno nei prossimi decenni, rappresentando una seria minaccia anche per la salute umana.

I medici veterinari rappresentano la prima linea di difesa contro la LCan e negli ultimi anni sono state sviluppate diverse linee guida per assistere i veterinari nella corretta diagnosi, gestione e prevenzione della malattia. Tra le misure più urgenti da adottare, c'è l'organizzazione di campagne informative, attraverso varie forme di comunicazione, tra cui l'utilizzo di materiale cartaceo da distribuire agli ambulatori veterinari, ma anche per mezzo di posta spedita a domicilio, spot televisivi e volantini. La necessità di una corretta informazione rivolta ai proprietari dei cani nasce dal riscontro nella pratica professionale di un elevato grado di disinformazione dei clienti riguardo questa zoonosi. Ad eccezione di coloro che sono consapevoli della malattia, perché possessori di soggetti nei quali sia già stata diagnosticata, la maggior parte di essi spesso confonde la malattia con infezioni trasmesse da altri artropodi, o il flebotomo con le zanzare, e non distingue i prodotti specifici anti-feeding dai prodotti antiparassitari che agiscono solo nei confronti degli ectoparassiti permanenti del cane (pulci e zecche).

Al fine di migliorare la situazione epidemiologica nel nostro paese, sicuramente la sensibilizzazione dei proprietari dei cani sui rischi della leishmaniosi ha un ruolo primario. Molti, infatti, non sono a conoscenza del fatto che questa malattia si stia diffondendo sempre di più e soprattutto che il cane, una volta infettato, potrebbe infettare altri cani e persone. Sicuramente da apprezzare è il lavoro fatto dal network Leishmap® che fornisce informazioni sui periodi di maggior attività dei pappataci, che si estendono da metà maggio a fine settembre per il nord Italia, da metà maggio a metà ottobre per il centro e da inizio maggio a metà novembre per il sud Italia. È importante notare che questi periodi coincidono con i mesi dedicati a viaggi e vacanze. È dunque quanto mai essenziale conoscere la dislocazione dei focolai d'infezione nelle zone di destinazione, per gli spostamenti con cane al seguito, al fine di adottare misure di prevenzione adeguate. Dal 2015, ciò è possibile: i proprietari di cani possono avvalersi non solo della mappa cartacea che evidenzia con un codice colore la presenza dei comuni positivi per leishmaniosi, ma anche di un'applicazione per dispositivi mobili, la Scalibor Map®, per ora disponibile per il mondo Android. Attraverso

quest'applicazione gratuita, il proprietario di un cane può avere sempre con sé e in qualsiasi luogo del territorio nazionale uno strumento in grado di fornirgli in tempo reale informazioni importanti riguardo i rischi d'infezione da leishmaniosi cui il suo animale potrebbe andare incontro spostandosi nelle varie regioni. Oltre all'interazione con la mappa, attraverso la quale gli utenti possono controllare la presenza di focolai nella zona della destinazione, la Scalibor Map consente anche di sfruttare il posizionamento GPS del telefono, per verificare se ci si trovi in un'area dove vi sono state segnalazioni d'infezione. Essa fornisce inoltre l'elenco dei punti vendita dove si possono acquistare prodotti per la protezione del cane, individuando il negozio più vicino.

La conoscenza del rischio d'infezione consente di adottare adeguate misure di prevenzione: il sistema più efficace è quello di evitare il contatto con il vettore responsabile della trasmissione dell'infezione mediante l'applicazione, nei mesi a rischio, di prodotti anti-feeding, che impediscono al vettore di alimentarsi con il sangue del cane e quindi di infettarsi con, o trasmettere, il protozoo *Leishmania*. Ad oggi, la prevenzione è senza dubbio la più importante strategia per controllare e contrastare questa pericolosa malattia. Nelle Linee Guida dell'ISS viene sottolineata la necessità di applicare misure antivettoriali per il controllo del serbatoio canino, non soltanto ai cani non infetti ma anche a tutti i cani portatori, al fine di contenere il potenziale infettante e proteggere gli stessi da ulteriori re-infezioni.

Di recente sono stati compiuti numerosi progressi per quanto riguarda gli strumenti di controllo e prevenzione della leishmaniosi canina, compresi nuovi vaccini preventivi (Velez et al., 2020). Il controllo dei parassiti avviene attraverso mezzi chemioterapici o immunologici, che riducono o impediscono la trasmissione ad altri animali, compreso l'uomo. Sono necessari programmi di controllo della leishmaniosi che includano una combinazione di misure coordinate, sia negli individui che per la prevenzione nelle popolazioni serbatoio. In questa rassegna, questi progressi sono stati valutati in base agli obiettivi di controllo, compresi il vettore e il parassita. Le nuove formulazioni di insetticidi topici si sono dimostrate efficaci nel prevenire le punture del flebotomo e, di conseguenza, l'infezione. La vaccinazione rimane comunque la maggiore speranza per il controllo di tutte le forme della malattia, e lo sviluppo di un vaccino sicuro, efficace ed economico è una priorità fondamentale per la salute pubblica globale. Tuttavia, ad oggi è disponibile solo il vaccino Letifend. L'ostacolo principale nella progettazione di un vaccino è il passaggio dal laboratorio al campo e l'estrapolazione dei dati dai modelli animali all'uomo. Questa rassegna ha considerato le recenti scoperte nel campo dei vaccini antileishmania e le attuali difficoltà che ostacolano l'implementazione del vaccino.

# BIBLIOGRAFIA

2. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*. 2014 Jan;107(1):7-14. doi: 10.1093/qjmed/hct116.
3. Okwor I, Uzonna J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Mar;94(3):489-93. doi: 10.4269/ajtmh.15-0408.
4. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect*. 2014 Nov;69 Suppl 1:S10-8. doi: 10.1016/j.jinf.2014.07.016.
5. Cantacessi C, Dantas-Torres F, Nolan MJ, Otranto D. The past, present, and future of Leishmania genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol*. 2015 Mar;31(3):100-8. doi: 10.1016/j.pt.2014.12.012.
6. Steverding, D. The history of leishmaniasis. *Parasites Vectors* 10, 82 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
7. Lysenko AJ. Distribution of leishmaniasis in the Old World. *Bull World Health Organ*. 1971;44(4):515-20.
8. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013 Jun;27(2):123-47. doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x.
9. Cabral M, O'Grady J, Alexander J. Demonstration of Leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol*. 1992 Sep;14(5):531-9. doi: 10.1111/j.1365-3024.1992.tb00026.x.
10. Young, D.G.; Duncan, M.A. (1994) Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae), Memoirs of the American Entomological Institute, 54, Associated Publishers—American Entomological Institute, Gainesville, FL, USA, 1994
11. Solano-Gallego L, Lull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. *Vet Parasitol*. 2000 Jun 10;90(1-2):37-45. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00223-5.
12. Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in Leishmania. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1063-75. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.03.008.
13. Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of Leishmania infantum infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol*. 2007 Mar 15;144(1-2):162-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.09.017.
14. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999 May-Jun;17(3):279-89. doi: 10.1016/s0738-081x(99)00046-2.
15. Sacks DL. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol*. 2001 Apr;3(4):189-96. doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00115.x.

16. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001 May-Jun;95(3):239-43. doi: 10.1016/s0035-9203(01)90223-8.
17. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science.* 1984 Mar 30;223(4643):1417-9. doi: 10.1126/science.6701528.
18. Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol.* 2006 Apr;44(4):1318-22. doi: 10.1128/JCM.44.4.1318-1322.2006.
19. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994 Jan;62(1):229-35. doi: 10.1128/iai.62.1.229-235.1994.
20. Verso MG, Caracappa S, Vitale F, Vesco G, Picciotto D. Rilievi epidemiologici della leishmaniosi nel territorio italiano [Epidemiological aspects of leishmaniasis in Italian regions]. *G Ital Med Lav Ergon.* 2003 Oct-Dec;25(4):441-3.
21. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994 Jul-Sep;89(3):435-43. doi: 10.1590/s0074-02761994000300027.
22. Chacara D, Haouas N, Dedet JP, Babba H, Pralong F. Leishmaniasis in Maghreb: an endemic neglected disease. *Acta Trop.* 2014 Apr;132:80-93. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.12.018.
23. Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N, Rodrigues M. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop.* 2004 Jul;91(2):95-100. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.03.004.
24. Gaglio G, Brianti E, Napoli E, Falsone L, Dantas-Torres F, Tarallo VD, Otranto D, Giannetto S. Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. *Acta Trop.* 2014 May;133:73-7. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.02.008.
25. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol.* 2013;58:227-50. doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153557.
26. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, The LeishVet Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2011 May 20;4:86. doi: 10.1186/1756-3305-4-86.
27. Gharbi M, Mhadhbi M, Rejeb A, Jaouadi K, Rouatbi M, Darghouth MA. Leishmaniasis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Rev Sci Tech.* 2015 Aug;34(2):613-26. doi: 10.20506/rst.34.2.2384.
28. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008 Dec 20;158(4):274-87. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.07.028.

29. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57:1-88. doi: 10.1016/S0065-308X(04)57001-X.
30. Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, Dos Santos CCP, Frézard FJG, da Silva SM. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int.* 2018 Mar 29;2018:3296893. doi: 10.1155/2018/3296893.
31. Podaliri Vulpiani M, Iannetti L, Paganico D, Iannino F, Ferri N. Methods of Control of the *Leishmania infantum* Dog Reservoir: State of the Art. *Vet Med Int.* 2011;2011:215964. doi: 10.4061/2011/215964.
32. Sgorbini M., Bizzeti M. Lari A., Bedini D., Pazzagli M., Tognetti R., Corazza M. Manifestazioni cutanee associate a leishmaniosi nel cane 2009
33. Castagnaro M, Crotti A, Fondati A, Gradoni L, Lubas G, Maroli M, Oliva G, Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione parte i: Approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico, 2007
34. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5515-9. doi: 10.1128/JCM.43.11.5515-5519.2005.
35. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2007 Nov 10;149(3-4):139-46. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.07.007.
36. Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* 2010 Mar 11;15(10):19505.
37. Castelli, G.; Bruno, F.; Reale, S.; Catanzaro, S.; Valenza, V.; Vitale, F. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Quantification of Parasite Load by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *Pathogens* 2021, 10, 865. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070865>
38. Baneth G., Bourdeau P., Cardoso L., Ferrer L., Miró G., Oliva G., Pennisi M., Petersen C., Solano-Gallego L. *LeishVet*, Guida pratica per medici veterinari, la leishmaniosi nel cane e nel gatto 2018.
39. Rosypal AC, Troy GC, Duncan RB, Zajac AM, Lindsay DS. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum infantum*. *J Vet Intern Med.* 2005 Nov-Dec;19(6):802-9. doi: 10.1892/0891-6640(2005)19[802:uodtui]2.0.co;2.
40. Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J.* 2009 Jan;179(1):142-4. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.08.009.
41. de Fátima Madeira M, de O Schubach A, Schubach TM, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Leal CA, Melo CX, Confort EM, Marzochi MC. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol.* 2006 Jun 15;138(3-4):366-70. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.059.

42. Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M, Mancianti F. Leishmania infantum infection rates in Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol.* 1987 Oct;1(4):339-42. doi: 10.1111/j.1365-2915.1987.tb00364.x.
43. Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with Leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994 Jul-Aug;88(4):491-3. doi: 10.1016/0035-9203(94)90446-4.
44. Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Mar-Apr;64(3-4):119-24. doi: 10.4269/ajtmh.2001.64.119.
45. Maia, C., Cristo'va'õ, J., Ramada, J., Rola'õ, N., Campino, L., 2006. Diagn'õstico da leishmaniose canina pela te'cnica de PCR aplicada a sangue perif'rico em pape'is de filtro Resultados preliminares. *Vet. Med.* 47, 29–33.
46. Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J; Spanish HIV-Leishmania Study Group. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring Leishmania infantum infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002 Apr;96 Suppl 1:S185-9. doi: 10.1016/s0035-9203(02)90074-x.
47. Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, de Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL. An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods.* 2004 Sep;292(1-2):17-23. doi: 10.1016/j.jim.2004.05.009.
48. Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine Leishmania-specific cellular immunity. *Vet Parasitol.* 1998 Nov 16;79(3):213-20. doi: 10.1016/s0304-4017(98)00169-1.
49. Day MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet Parasitol.* 2007 Jun 20;147(1-2):2-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.03.037.
50. Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of Leishmania infantum infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Jul;40(7):2352-6. doi: 10.1128/JCM.40.7.2352-2356.2002.
51. Schallig HD, Canto-Cavalheiro M, da Silva ES. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 Oct;97(7):1015-8. doi: 10.1590/s0074-02762002000700015.
52. Gálvez R, Montoya A, Fontal F, Martínez De Murguía L, Miró G. Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine Leishmania infantum infection: A case of knowing your enemy. *Res Vet Sci.* 2018 Dec;121:94-103. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.10.008.
53. Apostolopoulos N, Mitropoulou A, Thom N, Moritz A. Update on therapy and prevention of canine leishmaniasis. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2018 Oct;46(5):315-322. doi: 10.15654/TPK-180089.

54. Miro, G., Galvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M.A., Molina, R., 2007. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dogs. *Vet. Parasitol.* 143, 375–379.
55. Gramiccia M. Recent advances in leishmaniasis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol.* 2011 Sep 8;181(1):23-30. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.04.019.
56. Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Solari Basano F, Latrofa MS, Tarallo VD, Dantas-Torres F, Capelli G, Stanneck D, Giannetto S, Otranto D. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2014 Jul 14;7:327. doi: 10.1186/1756-3305-7-327.
57. Paulin S, Frénais R, Thomas E, Baldwin PM. Laboratory assessment of the anti-feeding effect for up to 12 months of a slow release deltamethrin collar (Scalibor®) against the sand fly *Phlebotomus perniciosus* in dogs. *Parasit Vectors.* 2018 Sep 27;11(1):529. doi: 10.1186/s13071-018-3094-z.
58. Otranto D, Dantas-Torres F, de Caprariis D, Di Paola G, Tarallo VD, Latrofa MS, Lia RP, Annoscia G, Breitshwerdt EB, Cantacessi C, Capelli G, Stanneck D. *Prevention of canine leishmaniasis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin.* *PLoS One.* 2013;8(2):e56374. doi: 10.1371/journal.pone.0056374.
59. Brianti E, Napoli E, Gaglio G, Falsone L, Giannetto S, Solari Basano F, Nazzari R, Latrofa MS, Annoscia G, Tarallo VD, Stanneck D, Dantas-Torres F, Otranto D. *Field Evaluation of Two Different Treatment Approaches and Their Ability to Control Fleas and Prevent Canine Leishmaniasis in a Highly Endemic Area.* *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Sep 15;10(9):e0004987. doi: 10.1371/journal.pntd.0004987.
60. Ferroglio E, Poggi M, Trisciuglio A. *Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine Leishmania infantum infection prevention.* *Zoonoses Public Health.* 2008 Apr;55(3):145-8. doi: 10.1111/j.1863-2378.2007.01092.x.
61. Foglia Manzillo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L. *Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of Leishmania infection in kennelled stray dogs.* *Vet Parasitol.* 2006 Nov 30;142(1-2):142-5. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.06.029.
62. Papadopoulos E, Angelou A, Diakou A, Halos L, Beugnet F. *Five-month serological monitoring to assess the effectiveness of permethrin/fipronil (Frontline Tri-Act®) spot-on in reducing the transmission of Leishmania infantum in dogs.* *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2017 Jan;7:48-53. doi: 10.1016/j.vprsr.2016.12.005.
63. Molina R, Espinosa-Góngora C, Gálvez R, Montoya A, Descalzo MA, Jiménez MI, Dado D, Miró G. *Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against Phlebotomus perniciosus.* *Vet Parasitol.* 2012 Jul 6;187(3-4):529-33. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.01.024.
64. Bongiorno G, Bosco A, Bianchi R, Rinaldi L, Foglia Manzillo V, Gizzarelli M, Maurelli MP, Giaquinto D, El Houda Ben Fayala N, Varloud M, Crippa A, Oliva G, Gradoni L, Cringoli G. *Laboratory evidence that dinotefuran, pyriproxyfen and permethrin combination*

- abrogates Leishmania infantum transmissibility by sick dogs. Med Vet Entomol.* 2021 Nov 1. doi: 10.1111/mve.12553.
65. Zini E, Muscardin L, D'Anna N, Fondati A, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Roura X, Zatelli A, Maroli M. *Preventive measures of canine leishmaniosis in Italy: Attitudes of veterinarians based on a questionnaire. Prev Vet Med.* 2020 Oct;183:105148. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105148.
  66. Ntais P, Sifaki-Pistola D, Christodoulou V, Messaritakis I, Pralong F, Poupalos G, Antoniou M. *Leishmaniasis in Greece. Am J Trop Med Hyg.* 2013 Nov;89(5):906-15. doi: 10.4269/ajtmh.13-0070.
  67. Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G, Stanneck D. *Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniosis in kennelled dogs in an endemic area. Vet Parasitol.* 2007 Mar 31;144(3-4):270-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.09.012.
  68. Mercier P, Jasmin P, Sanquer A. *Prevention of sand fly attack by topical application of a permethrin/pyriproxyfen combination on dogs. Vet Ther.* 2003 Fall;4(3):309-16.
  69. Molina R, Miró G, Gálvez R, Nieto J, Descalzo MA. *Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against Phlebotomus perniciosus. Vet Rec.* 2006 Aug 12;159(7):206-9. doi: 10.1136/vr.159.7.206.
  70. Souza VB, Fujita A, Thomazini M, da Silva ER, Lucon JF Jr, Genovese MI, Favaro-Trindade CS. *Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (Vitis labrusca) winemaking pomace. Food Chem.* 2014 Dec 1;164:380-6. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.049.
  71. Miró G, Petersen C, Cardoso L, Bourdeau P, Baneth G, Solano-Gallego L, Pennisi MG, Ferrer L, Oliva G. *Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis: (Trends in Parasitology 33, 718-730; 2017). Trends Parasitol.* 2018 May;34(5):445. doi: 10.1016/j.pt.2017.11.003.
  72. Dantas-Torres F, Miró G, Baneth G, Bourdeau P, Breitschwerdt E, Capelli G, Cardoso L, Day MJ, Dobler G, Ferrer L, Irwin P, Jongejan F, Kempf VAJ, Kohn B, Lappin M, Little S, Madder M, Maggi R, Maia C, Marcondes M, Naucke T, Oliva G, Pennisi MG, Penzhorn BL, Peregrine A, Pfeiffer M, Roura X, Sainz A, Shin S, Solano-Gallego L, Straubinger RK, Tasker S, Traub R, Wright I, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. *Canine Leishmaniosis Control in the Context of One Health. Emerg Infect Dis.* 2019 Dec;25(12):1-4. doi: 10.3201/eid2512.190164.
  73. Oliva G, Roura X, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. *Guidelines for treatment of leishmaniosis in dogs. J Am Vet Med Assoc.* 2010 Jun 1;236(11):1192-8. doi: 10.2460/javma.236.11.1192.
  74. Oliva, Gaetano & Roura, Xavier & Crotti, Alberto & Zini, Eric & Maroli, Michele & Castagnaro, Massimo & Gradoni, Luigi & Lubas, George & Paltrinieri, Saverio & Zatelli, Andrea. (2008). *Canine Leishmaniosis: Guidelines For Diagnosis, Staging, Therapy, Monitoring And Prevention Part II: Therapeutic approach. Rivista ufficiale della SCIVAC.*
  75. Gradoni L. *Recenti sviluppi nella terapia delle leishmaniosi [Recent findings on the treatment of leishmaniosis]. Ann Ist Super Sanita.* 2001;37(2):255-63.

76. Travi BL, Miró G. *Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis: gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications. Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018 Oct 18;113(11):e180301. doi: 10.1590/0074-02760180301.
77. Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG. *Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. Vet J.* 2009 Feb;179(2):259-63. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.09.014.
78. Pennisi MG, De Majo M, Masucci M, Britti D, Vitale F, Del Maso R. *Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. Vet Rec.* 2005 Mar 12;156(11):346-9. doi: 10.1136/vr.156.11.346.
79. Baneth G, Shaw SE. *Chemotherapy of canine leishmaniosis. Vet Parasitol.* 2002 Jul 2;106(4):315-24. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00115-2.
80. Monteiro M, Prata S, Cardoso L, Pereira da Fonseca I, Leal RO. *Diagnosis and clinical management of canine leishmaniosis by general veterinary practitioners: a questionnaire-based survey in Portugal. Parasit Vectors.* 2021 Jun 7;14(1):306. doi: 10.1186/s13071-021-04799-y.
81. Kasabalis D, Chatzis MK, Apostolidis K, Petanides T, Athanasiou LV, Xenoulis PG, Mataragka A, Ikononopoulos J, Leontides LS, Saridomichelakis MN. *A randomized, blinded, controlled clinical trial comparing the efficacy of aminosidine (paromomycin)-allopurinol combination with the efficacy of meglumine antimoniate-allopurinol combination for the treatment of canine leishmaniosis due to Leishmania infantum. Exp Parasitol.* 2020 Jul;214:107903. doi: 10.1016/j.exppara.2020.107903.
82. Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P, Gravino AE. *Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. Parasit Vectors.* 2015 May 28;8:289. doi: 10.1186/s13071-015-0896-0.
83. Signorini M, Cassini R, Drigo M, Frangipane di Regalbano A, Pietrobelli M, Montarsi F, Stensgaard AS. *Ecological niche model of Phlebotomus perniciosus, the main vector of canine leishmaniasis in north-eastern Italy. Geospat Health.* 2014 Nov;9(1):193-201. doi: 10.4081/gh.2014.16.
84. Gangneux JP, Dullin M, Sulahian A, Garin YJ, Derouin F. *Experimental evaluation of second-line oral treatments of visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum. Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jan;43(1):172-4. doi: 10.1128/AAC.43.1.172.
85. Minodier P, Parola P. *Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Med Infect Dis.* 2007 May;5(3):150-8. doi: 10.1016/j.tmaid.2006.09.004.
86. Rafea M, Ingen-Housz-Oro S, Méry L, Le Turdu F, Wendling J, Pauwels C, Sigal-Grinberg M. *Traitement par fluconazole de la leishmaniose cutanée chez l'enfant. Ann Dermatol Venerol.* 2007 Aug-Sep;134(8-9):682-3. French. doi: 10.1016/s0151-9638(07)91833-5.
87. de Souza ML, Gonzaga da Costa LA, Silva EO, de Sousa ALMD, Dos Santos WM, Rolim Neto PJ. *Recent strategies for the development of oral medicines for the treatment of visceral leishmaniasis. Drug Dev Res.* 2020 Nov;81(7):803-814. doi: 10.1002/ddr.21684.

88. Reimão JQ, Pita Pedro DP, Coelho AC. *The preclinical discovery and development of oral miltefosine for the treatment of visceral leishmaniasis: a case history. Expert Opin Drug Discov.* 2020 Jun;15(6):647-658. doi: 10.1080/17460441.2020.1743674.
89. Sundar S, Olliaro PL. *Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. Ther Clin Risk Manag.* 2007 Oct;3(5):733-40.
90. Bianciardi P, Fasanella A, Foglia Manzillo V, Trotta T, Pagano A, Sorino S, Gradoni L, Oliva G. *The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. Parasitol Res.* 2004 Aug;93(6):486-92. doi: 10.1007/s00436-004-1170-0.
91. Toepp AJ, Petersen CA. *The balancing act: Immunology of leishmaniosis. Res Vet Sci.* 2020 Jun;130:19-25. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.02.004.
92. Velez R, Gállego M. *Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. Trop Med Int Health.* 2020 May;25(5):540-557. doi: 10.1111/tmi.13382.
93. Montoya A, Checa R, Marino V, Gálvez R, Portero M, De Mari K, Navarro C, Miró G. *Antibodies elicited by the CaniLeish® vaccine: long-term clinical follow-up study of dogs in Spain. Parasitol Res.* 2021 Apr;120(4):1471-1479. doi: 10.1007/s00436-021-07091-1.
94. Jain K, Jain NK. *Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. J Immunol Methods.* 2015 Jul;422:1-12. doi: 10.1016/j.jim.2015.03.017.
95. Moafi M, Rezvan H, Sherkat R, Taleban R. *Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. Int J Prev Med.* 2019 Jun 7;10:95. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM\_116\_18.
96. Calzetta L, Pistocchini E, Ritondo BL, Roncada P, Palma E, di Cave D, Mattei M, Britti D. *Immunoprophylaxis pharmacotherapy against canine leishmaniosis: A systematic review and meta-analysis on the efficacy of vaccines approved in European Union. Vaccine.* 2020 Oct 7;38(43):6695-6703. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.08.051.
97. Gradoni L. *Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. Vet Parasitol.* 2015 Feb 28;208(1-2):94-100. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.01.003.
98. Wylie CE, Carbonell-Antoñanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, Solano-Gallego L. *A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: vaccinations. Prev Vet Med.* 2014 Nov 1;117(1):7-18. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.06.015.
99. Montserrat-Sangrà S, Alborch L, Ordeix L, Solano-Gallego L. *TLR-2 and TLR-4 transcriptions in unstimulated blood from dogs with leishmaniosis due to Leishmania infantum at the time of diagnosis and during follow-up treatment. Vet Parasitol.* 2016 Sep 15;228:172-179. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.09.005.
100. Oliva G, Nieto J, Foglia Manzillo V, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, Scalone A, Moreno J, Chicharro C, Carrillo E, Butaud T, Guegand L, Martin V, Cuisinier AM, McGahie D, Gueguen S, Cañavate C, Gradoni L. *A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two leishmania infantum transmission seasons. PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Oct 9;8(10):e3213. doi: 10.1371/journal.pntd.0003213.

101. Schaut RG, Grinnage-Pulley TL, Esch KJ, Toepp AJ, Duthie MS, Howard RF, Reed SG, Petersen CA. *Recovery of antigen-specific T cell responses from dogs infected with Leishmania (L.) infantum by use of vaccine associated TLR-agonist adjuvant. Vaccine.* 2016 Oct 17;34(44):5225-5234. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.09.016.
102. Fernandes CB, Junior JT, de Jesus C, Souza BM, Lorangeira DF, Fraga DB, Tavares Veras PS, Barrouin-Melo SM. *Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. Vaccine.* 2014 Mar 5;32(11):1287-95. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.12.046.
103. Di Muccio T, Scalone A, Bruno A, Marangi M, Grande R, Armignacco O, Gradoni L, Gramiccia M. *Epidemiology of Imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. PLoS One.* 2015 Jun 26;10(6):e0129418. doi: 10.1371/journal.pone.0129418.
104. Gradoni L, Ferroglio E, Zanet S, Mignone W, Venco L, Bongiorno G, Fiorentino E, Cassini R, Grillini M, Simonato G, Michelutti A, Montarsi F, Natale A, Gizzarelli M, Foglia Manzillo V, Solari Basano F, Nazzari R, Melideo O, Gatti D, Oliva G. *Monitoring and detection of new endemic foci of canine leishmaniosis in northern continental Italy: An update from a study involving five regions (2018-2019). Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2022 Jan;27:100676. doi: 10.1016/j.vprsr.2021.100676.
105. Morosetti G, Toson M, Trevisiol K, Idrizi I, Natale A, Lucchese L, Michelutti A, Ceschi P, Lorenzi G, Piffer C, Fiorentino E, Bongiorno G, Gradoni L. *Canine leishmaniosis in the Italian northeastern Alps: A survey to assess serological prevalence in dogs and distribution of phlebotomine sand flies in the Autonomous Province of Bolzano - South Tyrol, Italy. Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2020 Jul;21:100432. doi: 10.1016/j.vprsr.2020.100432.
106. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L. *The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. Trop Med Int Health.* 2008 Feb;13(2):256-64. doi: 10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x.

# SITOGRAFIA

1. <https://www.alessandroprota.it/la-cheratocongiuntivite-secca-kcs-nel-cane-e-nel-gatto/> 02/03/2022
2. <https://www.salute.gov.it/portale/sanitaAnimale/dettaglioContenutiSanitaAnimale.jsp?lingua=italiano&id=220&tab=1> 18/11/2021
3. <https://www.clinicaveterinarianasanmarco.it/diagnosi-sierologica-di-leishmaniosi-con-la-metodica-elisa/> 17/11/2021
4. <https://fgmdiagnostici.it/files/64.pdf> 17/11/2021
5. <https://www.biolab-srl.it/prodotti/leishmania/> data:02/11/2021
6. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/135003399#section=Identity> 07/02/2022
7. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/vectra-3d-epar-medicine-overview\\_it.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/vectra-3d-epar-medicine-overview_it.pdf) 08/02/2022
8. <https://www.prontuarioveterinario.it/> 08/02/2022
9. [https://www.salute.gov.it/portale/news/p3\\_2\\_2\\_1\\_1.jsp?lingua=italiano&menu=eventi&p=daeventi&id=491](https://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_2_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=eventi&p=daeventi&id=491) 13/02/2022
10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Allopurinol> 06/03/2022
11. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64953> 06/03/2022
12. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280965> 08/03/2022
13. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3599> 08/03/2022
14. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4735> 12/03/2022
15. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3151> 12/03/2022
16. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2007/10/15/07A08692/sg> 12/03/2022
17. <https://leish.info/canileish-impfung-mit-risiko/> 14/04/2022
18. <https://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2018/04/LeishVet-Guidelines-4Ed.pdf> 17/04/2022
19. <https://mypetandme.elanco.com/parassiti/leishmaniosi/diffusione-in-italia/> 21/05/2022
20. <https://www.salute.gov.it/portale/sanitaAnimale/dettaglioContenutiSanitaAnimale.jsp?lingua=italiano&id=220&tab=2> 21/05/2022
21. Drugs and Lactation Database (LactMed) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2006—. Paromomycin. 2021 Jul 19. 14/03/2022