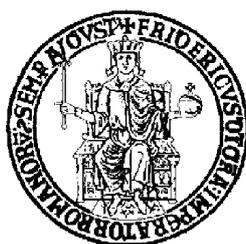


# Università degli Studi di Napoli “Federico II”

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE E  
FARMACOTOSSICOLOGICHE VETERINARIE



*Indirizzo in Medicina Interna degli Animali Domestici*

*Tesi Sperimentale*

*Studio clinico e parassitologico di campo (FASEIII) per la  
valutazione di un prodotto vaccinale anti-Leishmania in cani  
naturalmente esposti.*

*Parte I: valutazione dell'infezione.*

**Dott.ssa** Rosa Paparcone

**Tutor**

**Prof. Gaetano Oliva**

**Coordinatore**

**Prof. Paolo Ciaramella**

# INDICE

<b>PREMESSA</b>	pag. 4
<b>CAPITOLO 1</b>	
1.1 Introduzione	pag. 5
1.2 Eziologia	pag. 7
1.3 Organizzazione del genoma	pag. 9
1.4 Ciclo biologico	pag. 13
1.4.1 Serbatoio	pag. 13
1.5 Vettore	pag. 15
1.6 Patogenesi	pag. 18
1.7 Sintomatologia	pag. 21
1.8 Diagnosi	pag. 23
1.9 Terapia	pag. 30
1.10 Prevenzione	pag. 33
<b>CAPITOLO 2</b>	
2.1 Introduzione	pag. 34
2.2 La vaccinazione: concetti generali	pag. 35
2.3 Vaccini convenzionali	pag. 36
2.3.1 Vaccini inattivati	pag. 36
2.3.2 Vaccini vivi attenuati	pag. 36
2.4 Vaccini di nuova generazione	pag. 37
2.4.1 Vaccini di subunità e vaccini sintetici	pag. 37
2.4.2 Vaccini vivi deleti	pag. 37
2.4.3 Vaccini ricombinanti vivi	pag. 38
2.4.4 Vaccini a DNA	pag. 38
2.4.5 Conclusioni	pag. 38
2.5 Sviluppo, registrazione, produzione dei vaccini	pag. 39
2.6 Problematiche nella produzione di vaccini anti-Leishmania	pag. 40
2.7 Molecole vaccinali sperimentate contro la leishmaniosi canina	pag. 42
<b>CAPITOLO 3</b>	
3.1 Scopo dello studio	pag. 46
3.2 Caratteristiche del vaccino	pag. 47
3.3 Materiali e Metodi	pag. 48
3.4 Descrizione delle metodiche	pag. 51
3.4.1 siero	pag. 51
3.4.2 aspirato midollare	pag. 51
3.4.3 aspirato linfonodale	pag. 51
3.4.4 terreno di coltura: Evans' modified Tobie's medium (EMTM)	pag. 51
3.4.5 test di immunofluorescenza indiretta (IFAT)	pag. 52
3.4.6 estrazione del DNA	pag. 53

3.4.7 PCR	pag. 54
3.4.8 nested (n)-PCR	pag. 55
3.4.9 real time PCR	pag. 55
3.5 Risultati	pag. 56
3.5.1 Reazioni avverse	pag. 76
3.6 Discussioni	pag. 77
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 79

## PREMESSA

La presente tesi, unitamente a quella della candidata Roberta De Santo, descrive le metodiche e i risultati non completi di uno studio clinico di Fase III (esposizione dei soggetti all'infezione naturale) condotto in Italia per valutare l'efficacia di un vaccino anti-Leishmania, sia nei confronti dell'attecchimento dell'infezione (tesi della dr.ssa Papparcone), sia per valutare il grado di protezione nell'eventuale progressione dell'infezione verso la malattia (tesi della dr.ssa De Santo). Uno studio analogo, che utilizza lo stesso protocollo descritto nelle succitate tesi, è stato condotto anche in un'altra nazione europea, senza che le candidate siano a conoscenza dei risultati ottenuti. Il trial clinico, regolarmente autorizzato dal Ministero della Salute, è stato supportato da una casa farmaceutica veterinaria alla quale appartengono i diritti di pubblicazione dei risultati nella loro interezza. Per i motivi sopra esposti, i risultati e le conclusioni descritti nelle presenti tesi NON SONO da considerare assolutamente sovrapponibili a quelli complessivi e definitivi e non costituiscono alcuna indicazione favorevole o sfavorevole per l'utilizzazione in commercio del vaccino stesso. Inoltre, quanto descritto nel paragrafo "Caratteristiche del vaccino" si riferisce ad una composizione di base già descritta in letteratura, ma parzialmente diversa da quella effettivamente utilizzata nel presente studio, ancora coperta da segretezza. Lo scopo principale delle presenti tesi, quindi, non è quello di fornire dati a sostegno o a sfavore dell'efficacia del vaccino, quanto piuttosto quello di divulgare un modello ideale di studio di un vaccino anti-Leishmania, applicabile in una fase clinica III, secondo criteri di Good Clinical Practice.

# CAPITOLO 1

## 1.1 INTRODUZIONE

La leishmaniosi è una malattia infettiva a carattere zoonosico, ad interessamento sistemico ed evoluzione generalmente cronica, causata da protozoi del genere *Leishmania*. E' trasmessa da varie specie di pappatacei ematofagi del genere *Phlebotomus*, nel Vecchio Mondo e *Lutzomyia* nel Nuovo Mondo (Slappendel e Ferrer, 2003).

All'interno di questi insetti i protozoi moltiplicano e si trasformano in organismi infettivi.

Nell'uomo la malattia si esprime con una sintomatologia abbastanza polimorfa che consente la distinzione di tre forme cliniche: (1) viscerale (LV), (2) cutanea (LC) e (3) mucocutanea (LMC) (WHO, 1993). Nel cane (serbatoio della forma viscerale zoonotica - ZVL) la leishmaniosi è paragonabile, per alcune sue espressioni cliniche, alla forma viscerale umana. La malattia è stata segnalata anche in diversi roditori selvatici e, sebbene raramente, in numerosi altri mammiferi: bovino, pecora, capra, cavallo (forma enzootica segnalata in Venezuela), pony, sciacallo, orso, cammello, scoiattolo del Marocco, volpe (Marcato, 2001) e gatto (Gramiccia et al., 2005). La malattia, a diffusione praticamente cosmopolita (fig. 1.1), allo stato attuale è segnalata in 88 paesi diversi, ha una prevalenza di 12-14 milioni di ammalati e un'incidenza di circa due milioni di casi nuovi all'anno, dei quali 500.000 di

leishmaniosi viscerale e 1.500.000 di forme cutanee (Desjeux, 1996).

In Italia la malattia, considerata tradizionalmente endemica nel territorio dei paesi che affacciano sulla costa tirrenica (Pampiglione et al., 1981; Pozio et al., 1985; Bettini et al., 1986), si è dimostrata presente anche in zone del Nord Italia fino a pochi anni fa ritenute indenni (Natale, 2004; Capelli et al., 2004). Secondo alcuni Autori, infatti, la presenza di nuovi foci in Italia è probabilmente collegata a fattori climatici che influenzano la biologia del vettore, all'abitudine, ormai in aumento, di avere nell'ambito domestico i cani, e al trasporto di cani infetti da regioni endemiche ad aree indenni, incluso città dove i vettori della *Leishmania* già esistono (Buongiorno et al., 2003). Inoltre l'Italia si trova in una posizione particolare per quanto riguarda l'Europa:

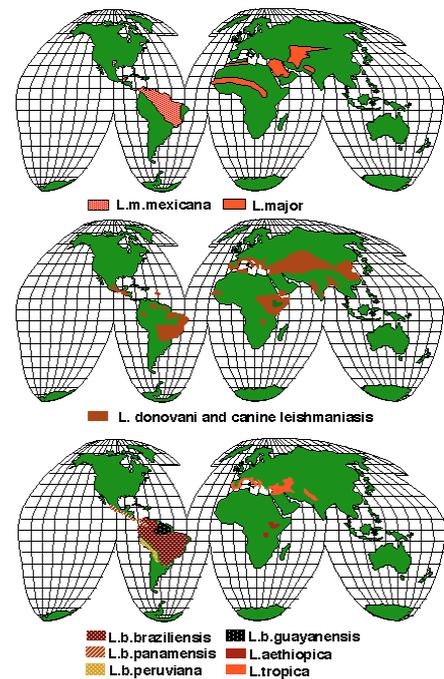


Fig. 1 Distribuzione geografica di *Leishmania* (per gentile concessione di <http://www.leishmania.org/>).

viviamo in un territorio fortemente endemico per leishmaniosi ma “soffriamo” anche di numerosi casi di importazione di leishmanie esotiche in quanto rappresentiamo un ponte Est-Ovest per quanto riguarda le popolazioni di flebotomi vettori (infatti annoveriamo specie “occidentali” come *P. ariasi* e *P. perniciosus*, ma anche specie “orientali” come *P. perfilievi* e *P. neglectus*); ma ci dobbiamo aspettare che nel prossimo futuro si stabilisca un altro ponte in direzione Sud-Nord, per esempio dal Nord Africa dove circolano quattro diverse entità nosogeografiche di leishmaniosi (Gradoni et al., 2001).

## 1.2 EZIOLOGIA

L'agente eziologico della leishmaniosi è un protozoo appartenente all'ordine Kinetoplastida, famiglia Trypanosomatidae, genere *Leishmania*, subgenere *Leishmania*. Nel subgenere *Leishmania* si riconoscono raggruppamenti di specie (tabella 1.1) (Marcato, 2001).

- **Leishmania**
  - **Leishmania**
    - **Leishmania aethiopica species complex**
      - **Leishmania aethiopica**
    - **Leishmania donovani species complex**
      - **Leishmania donovani**
    - **Leishmania infantum species complex**
      - **Leishmania infantum**
    - **Leishmania major species complex**
      - **Leishmania major**
      - **Leishmania cf. major**
    - **Leishmania mexicana species complex**
      - **Leishmania amazonensis**
      - **Leishmania emietti**
      - **Leishmania mexicana**
      - **Leishmania pifanoi**
    - **Leishmania tropica species complex**
      - **Leishmania tropica**
  - **lizard Leishmania**
    - **Leishmania adleri**
    - **Leishmania gynnodactyli**
    - **Leishmania hoogstraali**
    - **Leishmania tarentolae**
  - **Viannia**
    - **Leishmania braziliensis species complex**
      - **Leishmania braziliensis**
      - **Leishmania colombiensis**
      - **Leishmania equatorensis**
      - **Leishmania peruviana**
    - **Leishmania garhmani**
    - **Leishmania guyanensis species complex**
      - **Leishmania garhmani**
      - **Leishmania guyanensis species complex**
        - **Leishmania guyanensis**
        - **Leishmania panamensis**
        - **Leishmania shawi**
      - **Leishmania lainsoni species complex**
        - **Leishmania lainsoni**
      - **Leishmania naiffi species complex**
        - **Leishmania naiffi**
    - **unclassified Leishmania**
      - **Leishmania arabica**
      - **Leishmania deanei**
      - **Leishmania gerbilli**
      - **Leishmania guliki**
      - **Leishmania herreri**
      - **Leishmania hertigi**
      - **Leishmania killicki**
      - **Leishmania turanica**
      - **Leishmania sp.**
      - **Leishmania sp. AM-2004**
      - **Leishmania sp. MHOM/IN/2003/NAV-122**
      - **Leishmania sp. MHOM/IN/2003/NAV-131**
      - **Leishmania sp. MHOM/IN/2003/NAV-132**
      - **Leishmania sp. MHOM/IN/2003/NAV-135**
      - **Leishmania sp. MHOM/MQ/92/MARI**
      - **Leishmania sp. SA-2000**

**Tabella 1.1.** Dal Taxonomy Browser di National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5658>

La classificazione del Genere *Leishmania*, data da diversi autori, è in continuo aggiornamento e può differire più o meno sensibilmente. Ad esempio, la specie del Nuovo Mondo *Leishmania chagasi* è diffusamente considerata identica a *L. infantum*, tuttavia autori latino-americani considerano ancora le due specie distinte. Analoga situazione si riscontra con le specie *Leishmania archibaldi* e *Leishmania killicki* considerate specie distinte da quelle strettamente correlate *L. donovani* e *Leishmania tropica*, rispettivamente, da alcuni studiosi ma non da altri. Infine, non mancano esempi di specie il cui stato tassonomico è ancora controverso, ne è un esempio *Leishmania colombiensis* (Kreutzer et al., 1991; Mendoza-Leon et al., 2002).

Negli ospiti indicati hanno luogo forme di leishmaniosi viscerale, in rari casi sono descritte forme esclusivamente cutanee.

Vettori dei protozoi sono: *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus perfiliewi*, *Phlebotomus neglectus*, *Phlebotomus longiductus*, *Phlebotomus chinensis*, *Phlebotomus alexandri*. Tali flebotomi presentano una distribuzione geografica variabile, con *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus perfiliewi* che sono i vettori di *Leishmania infantum* più spesso rilevati in Italia (Bettini et al., 1986; Maroli et al., 1987, 1988, 1994a).

Un'ulteriore classificazione basata sulla moltiplicazione delle varie specie di leishmania nei diversi tratti del tubo digerente dei loro vettori, ha permesso di inquadrarle in ipo- peri- e suprapylaria, queste ultime considerate leishmanie di nostra pertinenza (Lainson and Shaw, 1979).

- *Hipopylaria* comprendono leishmanie indicate come proprie dei sauri; i protozoi si insediano e si sviluppano nella sezione enterica “posteriore” (piloro- ileo- retto) dei flebotomi vettori. Il contagio dei sauri si realizza presumibilmente con l’ingestione, da parte dei sauri medesimi, dei flebotomi parassitati.
- *Peripylaria* comprendono leishmanie parassite di mammiferi e di sauri; le fasi di sviluppo dei protozoi si attuano nella sezione enterica “posteriore” del flebotomo vettore, con migrazione poi dei protozoi nella sezione enterica “anteriore”; il contagio è determinata dalla puntura del flebotomo parassitato sul mammifero ospite e si presume, sul sauro ospite.
- *Suprapylaria* infine, comprendono leishmanie dei soli mammiferi; le fasi di sviluppo dei protozoi avvengono nelle sezioni enteriche “media” ed “anteriore” del flebotomo; il contagio è assicurato dalla puntura del flebotomo parassitato sul mammifero ospite.

### 1.3 ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA

I protozoi appartenenti all'ordine Kinetoplastida presentano un DNA genomico (DNAg) localizzato all'interno del nucleo cellulare, e deputato alla moltiplicazione del parassita, ed un DNA extragenomico, chiamato DNA del kinetoplasto (DNAk) situato all'interno dell'unico mitocondrio presente che si divide indipendentemente. Inoltre sono presenti DNA in forma di minisatelliti che sono sequenza ripetute in tandem, localizzate lungo il genoma a livello di regioni non codificanti, o degli estremi dei cromosomi come sequenze associate ai telomeri. Ancora esistono elementi circolari o episomi, localizzati nel nucleo.

La grandezza del genoma della *Leishmania* (nella sua versione aploide) varia a seconda della specie, il DNAg rappresenta l'80% del DNA totale.

Il materiale genetico dei protozoi dell'ordine Kinetoplastida è organizzato in cromosomi il cui numero esatto non è ancora noto.

In generale si sa che *Leishmania* è un parassita diploide, asessuato, e possiede un genoma costituito da 34 – 36 cromosomi. La numerazione dei 36 cromosomi è organizzata progressivamente, così da indicare con i numeri via più alti i cromosomi con le sequenze di basi più lunghe. Le specie del Vecchio Mondo (*L. major* e *L. donovani*) hanno 36 coppie di cromosomi (Wincker et al., 1996), mentre le specie del Nuovo Mondo hanno 34 (*L. mexicana/L. amazonensis*) o 35 coppie di cromosomi (*L. braziliensis*). Il minor numero di cromosomi tipico di alcune specie è da attribuirsi alla fusione di alcuni cromosomi, 8/29 e 20/36 in *L. mexicana* e *L. amazonensis*, o dei cromosomi 20 e 34 in *L. braziliensis* (Britto et al., 1998). I cromosomi hanno una grandezza di 0,15 megabasi, nel caso dei mini-cromosomi, e fino a quattro megabasi in quelli di maggiore grandezza. In particolare, *L. infantum* ha un genoma costituito da 35,5 megabasi ( $3,55 \times 10^7$  nucleotidi) con 36 cromosomi di 0,35-3,0 megabasi (Ortiz et al., 1995). I cromosomi possiedono un dominio centrale conservato e estremità polimorfiche, o regioni telomeriche, formate da sequenze ripetute che non si condensano durante il ciclo mitotico, ciò impedisce lo studio di questi cromosomi mediante studi convenzionali. Tra le due zone del cromosoma esiste una regione subtelomerica che interviene nel processo di segregazione cromosomica ed ha interesse tassonomico.

In condizioni di stress o sotto pressione farmacologica il protozoo può amplificare segmenti del suo genoma come geni minicromosomiali.

Fino ad ora non è stato ancora dimostrato se i geni di *Leishmania* contengano introni e, in linea generale, i geni vengono trascritti come precursori di RNA policistronici. Questi vengono processati mediante l'aggiunta di una sequenza conosciuta di 39 nucleotidi all'estremo 5', denominata sequenza "spiced-leader", e poliadenilazione dell'estremo 3', dando così luogo a

RNAm monocistronici individuali. Questo processo è noto come “trans-splicing” (Chance et al., 1982).

Per quanto riguarda la riproduzione del parassita, durante gli ultimi anni è stata suggerita l'ipotesi di una riproduzione sessuata (Brewster et al., 1998), con scambio genetico come avviene per altri parassiti. Anche se questo tipo di riproduzione non è stata dimostrata per la *Leishmania*, esistono alcuni aspetti che la suggeriscono:

1) la *Leishmania* è diploide di fatto: quando si vuole sostituire un gene perché il parassita perda la sua virulenza e possa essere in tal modo impiegato come vaccino, o per renderlo più vulnerabile all'azione dei farmaci, non è necessario inattivare entrambi gli alleli per ottenere un mutante nullo omozigote (“knockouts”) (Krobitsch S et al., 1999);

2) in varie occasioni sono state descritte forme di ibridi naturali. In Arabia Saudita sono stati isolati due ceppi, uno da un roditore del deserto e l'altro da un cane domestico che, attraverso studi isoenzimatici e analisi dell'organizzazione genomica, sono stati considerati ibridi naturali di *L. mayor* e *L. arabica* (Kelly JM 1991). Entrambi vivono nella stessa zona e utilizzano lo stesso vettore, *Phlebotomus papatasi*, ciò comporterebbe ampie opportunità di associazione tra le due specie. Anche in Perù, nella valle di Huanuco, una nicchia ecologica isolata, è stata dimostrata l'esistenza di ibridi di *L. peruviana* e *L. braziliensis* mediante tipizzazione isoenzimatica, cariotipo e RAPD (Dujardin JC 1995). I tentativi di formare ibridi del parassita nel vettore, ossia dove in condizioni naturali si incrocerebbero le specie, sono però sempre falliti.

**DNA circolare extracromosomico e minicromosomi.** Nel genoma della *Leishmania*, oltre alla presenza dei cromosomi, sono stati identificati anche elementi genetici circolari (da 30 a 200 kilobasi) che contengono copie multiple dei geni che codificano gli enzimi bersaglio di alcuni farmaci. Questi elementi sono il risultato di processi di amplificazione del genoma a partire da un cromosoma di origine. Si formano in risposta alla pressione esercitata da alcuni farmaci e permettono lo sviluppo della resistenza nei confronti degli stessi.

La *Leishmania* possiede, inoltre, i microcromosomi che possono formarsi spontaneamente o in conseguenza ad esposizione a condizioni avverse come la pressione terapeutica, e sono il risultato di amplificazioni di sequenze genomiche (Ortiz et al., 1995).

**Kinetoplasto.** E' una struttura localizzata all'interno del mitocondrio dei protozoi appartenenti all'ordine Kinetoplastida. E' costituito da un disco, visibile al microscopio ottico, che contiene  $10^7$  paia di basi di DNA mitocondriale o DNA<sub>k</sub> (Chance ML.; Walton BC. 1982). Il DNA<sub>k</sub> rappresenta il 20% dell'intero genoma del parassita ed è formato da una rete di migliaia di molecole circolari, maxicircolo e minicircolo, concatenate covalentemente. Il DNA<sub>k</sub> contiene 50 maxicircoli di 30-40 kilobasi che possiedono una regione stabile ed una variabile. Gli si attribuisce

la stessa funzione del DNA mitocondriale degli altri sistemi cellulari, come contenere i geni che codificano gli RNA ribosomiali e alcune proteine mitocondriali.

I minicircoli sono le molecole più piccole del DNAk (450-2500 paia di basi in relazione alla specie). Contengono gli RNA guida, implicati nella correzione del RNAm codificato dai maxicircoli e, quindi, i minicircoli fanno parte della struttura e dei meccanismi di riproduzione del DNAk. Il DNAk contiene da 10.000 a 20.000 minicircoli che possiedono una sequenza di nucleotidi variabile (80%) e circa 120 paia di basi stabili. Le diverse specie di *Leishmania* hanno da otto a venti famiglie di minicircoli, in relazione alla loro dimensione.

Uno stesso ceppo può rimanere inalterato mentre la sequenza dei suoi minicircoli può cambiare attraverso mutazioni o ricombinazioni con altre catene di minicircoli già esistenti, ciò comporta una loro elevata variabilità che contribuisce alla rapida evoluzione del DNAk. Tale variabilità non sembra avvenire sempre, è stata provata infatti la stabilità di alcune classi di minicircoli nel tempo ed in aree geografiche distanti. (Brewster S. et al., 1998).

I minicircoli del DNAk trascrivono, come detto in precedenza, RNA guida incaricati della maturazione degli RNA primari, anello primario nell'adattamento del protozoo ai diversi ambienti in cui dovrà sopravvivere a seconda della sua fase morfologica e delle necessità fisiologiche di ogni fase. Questo processo post-trascrizionale è noto come RNA editing.

**Variazione della struttura proteica.** Il passaggio da promastigote ad amastigote è una condizione di stress per il parassita che prevede un drastico cambiamento morfologico e la conseguente induzione di nuove proteine strutturali e la sostituzione di altre (Clos J., Krobitch., 1999). Tra queste in particolare le proteine ribosomiali che intervengono nei processi di sintesi proteica ed inducono la risposta umorale: la famiglia degli istoni, importanti nell'organizzazione e funzionamento del DNA nucleare, e che vengono riconosciute dagli anticorpi che si sviluppano in soggetti affetti da forme di leishmaniosi umana e in caso di leishmaniosi canina; le chinesine (es K39) che agiscono come "motori" del parassita e sono anch'esse responsabili di indurre una forte risposta umorale; la proteina omologa dei recettori dalle chinasi C attivata (LACK) che interviene in numerose funzioni cellulari; proteine antiossidanti, etc.

Di notevole interesse sono le proteine di shock termico (heat shock proteins – hsp), in quanto rappresentano la chiave nel processo di adattamento del parassita ai diversi ambienti e rivestono un ruolo centrale nella virulenza del parassita. I geni che regolano l'espressione proteica hsp sono influenzati dalla variazione della temperatura all'interno dell'insetto poichilotermico (tra 22 e 28°C) e nell'ospite vertebrato omotermico (37°C). Alcune proteine maggiori, come hsp60, hsp70, hsp83, vengono sintetizzate durante stress termici ma, a partire da 42°C, la loro sintesi si interrompe definitivamente.

Lo shock termico non è l'unico meccanismo che provoca l'espressione delle proteine *HSP* in quanto possono intervenire altri fenomeni come la stessa fagocitosi del parassita all'interno del macrofago. La rapida espressione delle proteine HSP e la concentrazione relativamente elevata all'interno del macrofago, suggerisce la loro partecipazione nella patogenesi della malattia.

## 1.4 CICLO BIOLOGICO

Le leishmanie sono organismi dicensi che completano il loro ciclo biologico tra due ospiti, un vertebrato che svolge il ruolo di serbatoio (vedi box) della malattia, ed un invertebrato che assume il ruolo di vettore (Urquhart et al., 1998).

Alcuni autori distinguono tra un ciclo biologico domestico ed un ciclo biologico silvestre coinvolgenti, rispettivamente, cani domestici e cani randagi. Questi ultimi sembrano essere i responsabili principali della diffusione della malattia (Baneth et al., 1998), l'esistenza di un ciclo silvestre indipendente da cani infetti è poco probabile (Moreno e Alvar, 2002).

Il ciclo ha inizio quando l'insetto vettore, durante il pasto di sangue su un ospite vertebrato infetto, assume il parassita sotto forma di amastigote. Gli amastigoti appaiono dentro il macrofago come organismi rotondi od ovoidali con il chinetoplasto, a bastoncino, situato adiacente al nucleo dell'organismo, che misura dai 2 ai 5  $\mu\text{m}$  di diametro, e possiede un abbozzo di flagello che non si estende oltre il margine cellulare (secondo alcuni autori sarebbe meglio definibile, per essere fornito solitamente di abbozzo di flagello, micromastigote o endomastigote) (Urquhart et al., 1998). Gli amastigoti rilasciati all'interno del vettore si trasformano nella forma flagellata, il promastigote, che segue diverse tappe di sviluppo all'interno dello stesso.

Sotto forma di promastigote si trova ancorato ai microvilli del tubo digerente degli insetti trasmettitori grazie al lungo flagello; il corpo misura circa 10 micron e possiede un chinetoplasto molto vicino al nucleo cellulare (*promastigote nectomona*) (Fig. 1.2). Progredendo verso le porzioni anteriori dello stomaco del flebotomo, il corpo diviene più corto e il flagello, ricco di lipofosfoglicani, si accorcia per facilitare l'adesione alle lectine che rivestono il tubo

### 1.4.1 SERBATOIO

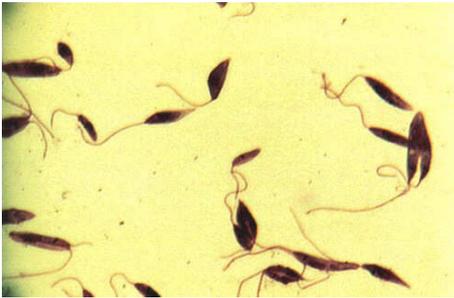
Si definisce serbatoio di una malattia, l'animale che garantisce la sopravvivenza dell'agente eziologico e la sua successiva trasmissione. Il serbatoio per essere considerato tale deve rispondere ad alcuni requisiti:

- la relazione tra animale e vettore deve essere stretta;
- l'animale deve essere ben rappresentato all'interno della nicchia ecologica in cui si manifesta la malattia;
- l'infezione deve assumere un decorso cronico in modo che i parassiti siano presenti in quantità e tempo sufficienti per assicurare l'infezione degli insetti vettori (Alvar et al., 1996).

### Approfondimento

Il parassita è trasmesso da un cane infetto ad un cane non infetto dal morso del flebotomo, anche se sono stati riportati sia la trasmissione diretta cane-cane (Gaskin et al., 2002) che quella da trasfusione di sangue (Owens et al., 2001). L'uomo è infettato accidentalmente e non funge da serbatoio per la leishmania, eccetto in casi dove siringhe contaminate vengono scambiate tra tossicodipendenti (Cruz et al., 2002).

digerente, il chinetoplasto è localizzato in posizione anteriore ed è privo di capacità infettante (*promastigote aptomona*).



**Figura 1.2. Promastigoti in cultura,**  
per gentile concessione di  
<http://www.leishmania.org/>.

Dopo circa dieci giorni dal suo ingresso nell'insetto vettore, il promastigote perde la sua aderenza a causa del cambiamento della configurazione dei lipofosfoglicani, il flagello diviene molto lungo rispetto al corpo stretto e corto, si forma una borsa flagellare ripiena di vescicole e materiale di secrezione; in questo stadio il parassita smette di replicarsi ma riacquista il suo potere infettante, e si localizza già libero nell'ipofaringe, pronto per essere

inoculato (*promastigote metaciclico*) (Sascks et al., 1984). I promastigoti vengono così trasmessi ad un nuovo ospite quando il flebotomo compie un secondo pasto di sangue.

La durata del ciclo nel flebotomo varia da 4 a 20 giorni ed è influenzata soprattutto dalla temperatura ambiente.

Nell'ospite vertebrato i promastigoti vengono fagocitati dai monociti/macrofagi. L'adesione del promastigote alla membrana cellulare è mediata da diverse molecole di superficie del protozoo come la glicoproteina di 63 kd (gp63) ed il lipofosfoglicano (LPG), e dall'interazione fra il parassita e i recettori specifici sulla superficie del macrofago. Questo sistema di aggancio è di fondamentale importanza nella biologia del parassita (Ferguson et al., 1994).

Una volta fagocitato, il promastigote si trasforma in amastigote, trasformazione probabilmente stimolata dal cambiamento di temperatura e da altri fattori ancora poco noti. Gli amastigoti si dividono per scissione binaria all'interno del vacuolo parassitoforo finché non raggiungono un numero tale da portare a rottura il macrofago. Gli amastigoti così liberati saranno poi fagocitati da altri macrofagi (Urquhart et al., 1998).

## 1.5 VETTORE

I vettori di *Leishmania* sono ditteri *Nematoceri* che appartengono alla sottofamiglia *Phlebotominae*.

I flebotomi (fig. 1.3), ditteri di piccole dimensioni (circa 2-3 mm di lunghezza e 0,5 mm di larghezza), sono di colore giallo-biancastro, muniti di lunghe zampe, con corpo e ali coperti da una fitta peluria.

La testa è munita di due occhi, di una lunga antenna e di una proboscide sviluppata come apparato di “puntura- suzione”. I maschi si nutrono di succhi vegetali zuccherini mentre le femmine sono ematofaghe.

Il torace è robusto e su di esso si inseriscono le ali e 2 bilancieri (ali trasformate che servono al bilanciamento del volo). Le ali sono ricoperte da una sorta di squame e da peli. In ciascuno dei tre segmenti toracici, fusi e articolati tra loro, si articola un paio di zampe, ricoperto da peluria.



**Figura 1.3.** Flebotomo, per gentile concessione di <http://www.leishmania.org/>.

L’addome è costituito da dieci segmenti, gli ultimi tre modificati per costituire l’apparato genitale. Il maschio possiede una forte struttura genitale che gli consente di trattenere la femmina durante l’accoppiamento per depositare il seme all’interno della spermateca. Nella femmina, invece, gli ultimi due segmenti addominali formano due lobature laterali e due cerchi.

La saliva possiede sostanze tensioattive, antiplastriniche e vasodilatatrici che provocano la fuoriuscita del sangue dal sito della puntura e facilitano il suo fluire attraverso il canale alimentare del flebotomo (Theodos et al., 1991).

I flebotomi sono presenti in diverse zone del mondo, realizzano il loro ciclo completo durante tutto l’anno nelle aree tropicali, dal mese di maggio al mese di ottobre nelle regioni del bacino mediterraneo.

Il loro habitat varia da quello umido, tipico della selva, a quello di regioni aride, con una distribuzione tra il livello del mare ed i 1500 metri o più di altezza.

### Requisiti del vettore (Maroli, 1989)

1. Distribuzione geografica coincidente con quella della malattia;
2. Dimostrata antropofilia e zoofilia;
3. Trovato infetto naturalmente con lo stesso parassita che determina malattia nell’uomo e nel cane;
4. Dimostrata sperimentalmente la capacità di trasmettere il parassita.

I flebotomi hanno attività crepuscolare e notturna, necessitano di temperature superiori ai 18°. Hanno capacità di volo limitata, non si spostano più di qualche centinaio di metri, e sono disturbati dalle correnti d'aria; nelle notti ventose infatti, la loro attività è molto ridotta.

Le femmine, una volta alimentatesi, tornano ai loro rifugi naturali per riposare e filtrare il sangue prima di localizzare il luogo adatto alla deposizione delle uova che, solitamente, avviene 4-5 giorni dopo il pasto di sangue.

L'adattamento del flebotomo all'ambiente in cui vivono gli animali vertebrati sui quali essi effettuano il loro pasto è un punto chiave perché avvenga la trasmissione della malattia, ed è determinato dai seguenti aspetti:

- carattere obbligatorio della trasmissione attraverso la puntura degli insetti;
- stretta relazione tra *Leishmania* e flebotomo;
- specificità di alimentazione di ciascuna specie di flebotomo verso un determinato vertebrato;
- habitat naturale che condiziona la distribuzione delle diverse specie di flebotomo;
- differente tendenza antropofila di ogni specie di flebotomo, che comporta un diverso rischio epidemiologico (Safjanova, 1991).

La maggior parte delle specie di flebotomi ha bisogno di ingurgitare sangue per poter sviluppare gli ovuli. Il tempo che separa il pasto di sangue e la deposizione della uova è detto ciclo gonotrofico. I flebotomi adulti vivono in media quattro settimane per cui compiono il ciclo gonotrofico tre o quattro volte.

Per poter valutare il rischi di trasmissione in una determinata zona, e quindi stabilire le opportune misure di controllo, è imprescindibile definire le capacità vettoriali delle specie di flebotomi presenti e quindi la pericolosità epidemiologica.

La capacità vettoriale viene condizionata da:

- densità di popolazione;
- indice di infestazione;
- lunghezza di vita dei flebotomi;
- durata del ciclo gonotrofico.

La densità di popolazione implica un'alta frequenza media di punture in conseguenza del maggior numero di flebotomi presenti (in una zona endemica un animale può ricevere decine di punture a notte).

A proposito del secondo punto, indice di infestazione, la dissezione del tubo digerente dei flebotomi permette di stabilire la proporzione dei positivi in modo che, in relazione con la frequenza delle punture, è possibile determinare teoricamente la periodicità di un puntura infetta.

La maggiore lunghezza della vita dei flebotomi aumenta le possibilità di infezione. La durata della vita di un flebotomo dipende dalla specie di flebotomo e da fattori climatici come la temperatura e l'umidità relativa. Da questi fattori dipende anche la metaciclo genesi, infatti temperature e umidità elevate riducono il tempo che occorre agli amastigoti ingeriti di trasformarsi in promastigoti infettanti. La combinazione tra l'aspettativa di vita e la durata della metaciclo genesi si traduce in un maggiore o minore rischio epidemiologico.

Una volta infettato, il flebotomo è capace di trasmettere la *Leishmania* ad ogni pasto che realizza per tutta la vita. Alcuni flebotomi e lutzomyia realizzano un solo pasto per ovulazione e rappresentano un minor rischio epidemiologico a differenza di altri, come il *Phlebotomus papatasi*, che hanno bisogno di alimentarsi ogni due giorni.

La trasmissione è inoltre influenzata da una serie di fattori legati all'eziologia dell'insetto: se pungono all'interno o all'esterno delle abitazioni, di notte o di giorno, se sono endo- o eso-filici. Gli insetti che pungono all'interno delle abitazioni, durante la notte, e riposano all'interno dell'abitazione dopo il pasto (endofilici), sono più facilmente controllabili attraverso l'uso di barriere meccaniche o insetticidi.

## 1.6 PATOGENESI

Con la puntura, operata dai flebotomi femmina, vengono liberati nel derma superficiale del cane i promastigoti metaciclici e una serie di varie sostanze, biologicamente attive, presenti nella saliva dei flebotomi. Le sostanze contenute nella saliva dei flebotomi sono molecole ad attività anti-aggregante piastrinica, vasodilatatrice e di promozione della diffusione del parassita nei tessuti (ialuronidasi) (Ribeiro, 1995). I parassiti, a questo punto, vengono fagocitati dai granulociti neutrofili e dai macrofagi (cellule di Langerhans – macrofagi cutanei). Sono soprattutto questi ultimi che hanno una notevole importanza nei processi difensivi dell'organismo, avendo il compito di processare e presentare gli antigeni ai linfociti T e B. Poiché leishmania è un antigene esogeno, i macrofagi ne presentano gli antigeni associati al complesso maggiore di istocompatibilità II (Major Histocompatibility Complex – MHC II) ai linfociti T CD4+. Tra i linfociti CD4+ si distinguono due principali sottopopolazioni: Th1 (T helper 1) e Th2 (T helper 2), aventi caratteristiche morfologiche identiche ma attività diverse e spesso anche contrapposte (Mosmann et al., 1986). I due tipi di linfociti CD4+ producono diverse citochine (tabella 1.2) ed attivano diversi tipi di risposte immunitarie (Marcato et al., 2002).

**Tabella 1.2 – Citochine prodotte dalle due popolazioni di linfociti CD4+**

Linfociti T helper 1	Linfociti T helper 2
IL-2, IL-12	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13
IF- $\gamma$	BSF-1
TNF- $\alpha$	

L'attivazione dei linfociti Th2 viene indotta, inizialmente, dalla IL-1 prodotta dai macrofagi ma, in seguito, la proliferazione di questi linfociti procede con meccanismo autocrino IL-4 dipendente (producono loro stessi IL-4). Questi linfociti sintetizzano e secernono anche le interleuchine 5 e 10 (Primez et al., 1993). Il passo successivo è l'attivazione (per contatto diretto o mediata da linfocine) Th2 dipendente dei linfociti B. Ciò si traduce nell'attivazione dell'immunità umorale e nella produzione di anticorpi specifici anti-leishmania. È di rilievo il fatto che questo tipo di risposta, Th2 mediata, è associata, nell'infezione sperimentale del topo, alla forma di malattia cronica-fatale caratterizzata, tra l'altro, dalla produzione di IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IgG1 (**RISPOSTA NON PROTETTIVA**) (Reed and Scott, 1993).

L'attivazione dei linfociti Th 1 comporta la secrezione di una serie di linfocine: IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12. L'IL-2, oltre a sostenere la replicazione autocrina degli stessi Th1, muniti di appositi recettori, induce la differenziazione dei linfociti T pre-citolitici a linfociti T citotossici. L'INF- $\gamma$  agisce sui macrofagi attivandoli ed inducendo una efficace azione effettrice contro i

microrganismi a crescita endocellulare (come la leishmania). I macrofagi, a loro volta, stimolano la modulazione dei Th1 producendo la IL-12, che favorisce l'espansione dei Th1 protettivi ed inibisce quella dei Th2 controprotettivi nei confronti dell'infezione da leishmania (**RISPOSTA PROTETTIVA**) (Manetti et al., 1993). Risposta protettiva che si caratterizza per la produzione di IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-3, IL-12 e IgG2 (Reed and Scott, 1993).

Ma perché le Leishmanie fagocitate dai macrofagi non vengono distrutte all'interno di queste cellule? Nei macrofagi sono attivi due meccanismi di distruzione dei patogeni: un meccanismo ossigeno dipendente, ed un meccanismo ossigeno indipendente. Il primo comporta la produzione di metaboliti ossidanti (un ruolo importante rivestono l'O<sub>2</sub> e l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), il secondo è mediato dall'azione di sostanze ad attività battericida quali la lattoferrina, le proteine cationiche, il lisozima, e da variazioni del pH (Murray and Edelson, 1981). Un ruolo importante nella distruzione macrofagica delle leishmanie è svolta dall'ossido nitrico (Bogdan, 1997). Nella membrana del kinetoplasto è presente la proteina 11 che veicola un carrier N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginina, importante inibitore dell'attività dell'enzima ossido nitrico sintetasi-2 (NOS-2) attraverso una azione di competizione con l'arginina (Jardim et al., 1995). Ma le leishmanie mettono in atto anche tutta una serie di strategie, per aggirare i meccanismi di distruzione macrofagica ossigeno indipendenti (tabella 1.3).

**Tabella 1.3 – Strategie usate dalle leishmanie contro i meccanismi di distruzione macrofagica ossigeno indipendenti**

<b>Molecola implicata</b>	<b>Meccanismo d'azione</b>
Lipofosfoglicano (LPG)	Ricco sulla superficie dei promastigoti, carente su quella degli amastigoti. Impedirebbe la fusione fagosoma-lisosoma (Desjardins et al., 1997, Mcneely et al., 1989).
Proteina gp63	Presente in grande quantità sulla superficie dei promastigoti. Inattiva gli enzimi proteolitici prodotti dal macrofago contro la leishmania (Medina-Acosta et al., 1989).
Glicoinositolfosfolipide (GIPLs)	Sembra ridurre l'attività della proteinchinasi C (Mcneely et al., 1989).
Fosfatasi acida	Contenuta dall'amastigote potrebbe bloccare la produzione di anione superossido nel macrofago e di una serie di enzimi in grado di degradare i prodotti leishmanicidi macrofagici (catalasi, seperossidodismutasi) (Manuel, 1990).

La ricerca scientifica è attualmente rivolta a comprendere quali i meccanismi che sottendono alla risposta immunitaria prevalentemente Th1 o prevalentemente Th2. Tra le ipotesi suggerite, c'è anche quella di una probabile predisposizione genetica su base multifattoriale (Mougneau et al., 1995). Per esempio, nel topo un riconoscimento aberrante di antigeni di superficie della *Leishmania*, da parte dei linfociti CD4+, determinerebbe una produzione eccessiva di IL-4 e di Th2 (Guler et al., 1996). Le sostanze prodotte dai Th2, come già visto, non proteggono l'organismo

dall'aggressione delle leishmanie e favoriscono anzi l'evoluzione della malattia (permettono una persistenza delle leishmanie "protette" all'interno dei macrofagi<sup>1</sup> ed una loro diffusione sistemica).

Questa attivazione abnorme, risulta nella continua sollecitazione delle cellule immunocompetenti, indotta dai parassiti posti al riparo nei fagociti, con una iperattività della risposta umorale (non protettiva), ed anomalie in quella cellulo-mediata: il tutto si traduce in uno stato immunopatologico caratterizzato essenzialmente da immunodepressione e dalla produzione di immunocomplessi (IC) circolanti. Gli IC sono ritenuti causa di molte complicazioni nel corso della Leishmaniosi, inoltre non è più da considerarsi di importanza secondaria l'abnorme produzione di anticorpi diretti anche contro strutture proprie dell'organismo. Nel cane sono stati evidenziati anticorpi anti-muscolo liscio, anti-muscolo cardiaco ed anti-eritrociti (anemia da Leishmaniosi), ed anche il fattore reumatoide. Inoltre, vengono prodotti anche anticorpi anti nucleo utilizzati anche a scopo diagnostico (ANA-test).

La proliferazione di linfociti B, delle plasmacellule, degli istiociti e dei macrofagi unitamente all'attrazione degli eosinofili determina una linfadenomegalia sistemica e a volte un'epatosplenomegalia e iperglobulinemia consistente. La formazione di immunocomplessi (CIC), può essere possibile, come conseguenza di una alterata regolazione delle cellule T con una esuberante attività delle cellule B (Lopez, et al., 1996). La deposizione degli CIC nelle pareti dei vasi ematici può determinare vasculiti, poliartriti, uveiti e glomerulonefriti. Nei cani il deposito di CIC nei reni, infine, provoca insufficienza renale, principale causa di morte nei soggetti leishmaniotici.

---

<sup>1</sup> I macrofagi richiamati nel sito d'infezione dalle cellule Th2 sarebbero cellule immature ed incapaci di distruggere le Leishmanie.

## 1.7 SINTOMATOLOGIA

Nel cane la sintomatologia è rapportabile alla forma viscerale dell'uomo con un evidente ed imponente coinvolgimento cutaneo.

Nonostante il contagio si verifichi nei periodi caldi (maggio – ottobre), nei quali la concentrazione dei flebotomi è alta, le manifestazioni cliniche della leishmaniosi possono comparire in qualsiasi stagione dell'anno; il periodo di incubazione può infatti essere di alcuni mesi fino a tre anni ed oltre.

L'età dei soggetti colpiti varia da uno a undici anni, con maggiore incidenza tra i cani di 3-7 anni che vivono all'aperto. Nella maggior parte dei casi la patologia assume un andamento subacuto o cronico. Raramente è possibile osservare nei cuccioli una fase acuta con comparsa di febbre alta (di tipo remittente o intermittente), tremori diffusi ed esito fatale (Buonaccorsi, 1995).

I segni clinici sono molto variabili e spesso iniziano con una lenta e progressiva debolezza e una insidiosa intolleranza all'esercizio. È sempre presente interessamento del sistema reticolo-endoteliale con coinvolgimento di linfonodi, fegato, milza e midollo osseo. La linfadenomegalia, il sintomo più frequente, può essere sistemica oppure interessare uno o più linfonodi; i prescapolari sono i linfonodi maggiormente colpiti molto verosimilmente in relazione alla loro stretta connessione con i vasi linfatici delle regioni anteriori dove, più comunemente, è possibile osservare lesioni cutanee. Alla palpazione i linfonodi si presentano aumentati di volume, non dolenti e di consistenza duro elastica. L'epato- e la splenomegalia sono un reperto meno costante.

Le alterazioni dermatologiche, anche esse frequentissime, variano in carattere e in estensione, ma raramente sono pruriginose. La maggior parte dei cani sviluppa una alopecia progressiva e simmetrica con intensa e secca desquamazione che inizia, di solito, dalla testa e si estende al resto del corpo. Ulcere localizzate sul naso e sulla pinna, noduli cutanei o linguai (Foglia Manzillo et al., 2009) o eruzioni di pustole possono essere presenti (Font et al., 1996; Kontas and Koutinas, 1993; Koutinas et al., 1992)

Frequente è il riscontro di lesioni oculari (uveite linfoplasmacellulare 42,8%, congiuntiviti e cheratocongiuntiviti 31,4%, blefariti diffuse ulcerative o meno 29,5%, alopecia perioculare 26,7%, glaucoma secondario ad uveite 7,1%, uveite posteriore con e senza distacchi retinici 3,8%, cheratocongiuntivite secca 2,8%, cellulite orbitale 1,9%) (Pena et al., 2000; Pugliese et al., 1992).

Onicogrifosi, un reperto piuttosto specifico, si nota in una piccola percentuale di pazienti. La perdita di peso e l'atrofia muscolare sono i segni più comuni di un coinvolgimento sistemico. Alcuni cani perdono peso nonostante l'appetito vorace, ma la perdita seria della condizione è, di solito, associata ad anoressia e a segni di insufficienza renale, compreso l'ottundimento del

sensorio, la poliuria, la polidipsia ed il vomito. Nei casi di malattia conclamata, l'attività fisica diminuita è correlata ad una riduzione delle resistenze, a sonnolenza e ha disturbi dell'apparato locomotore che si manifestano con atrofia muscolare, soprattutto dei muscoli facciali e temporali che conferisce il tipico aspetto di "cane vecchio", e con zoppie spesso intermittenti e migratorie causate da polimiositi ed artrosinoviti.

Il corteo sintomatologico del cane leishmaniotico riflette le svariate combinazioni che possono realizzarsi in virtù della diversa virulenza dei ceppi di leishmania in causa e delle condizioni immunitarie dell'animale.

Negli ultimi anni accanto alle forme cliniche tradizionali compaiono dei quadri nuovi, privi dei sintomi tipici, in cui la sintomatologia patologica è riferibile esclusivamente al coinvolgimento di un organo.

La compromissione renale può, in alcuni casi, rappresentare l'unica alterazione responsabile della sintomatologia (Ferrer, 1992). Talvolta le manifestazioni cliniche possono coinvolgere esclusivamente l'apparato muscolo-scheletrico (zoppia) (Buracco et al., 1997). Sono state descritte forme di leishmaniosi atipiche con sintomatologia esclusivamente enterica (enterite acuta e colite cronica emorragiche) (Ferrer et al., 1991), oppure manifestazioni quali il tamponamento cardiaco (Font et al., 1993). Inoltre nei cani è stata suggerita un'aumentata associazione tra leishmaniosi e neoplasia linfoide o emangiosarcoma (Margarito et al., 1994) .

Ed infine, le infezioni combinate con *Ehrlichia*, *Babesia* e *Dirofilaria* sono abbastanza comuni se l'infezione da *Leishmania* si verifica nelle regioni in cui anche questi microrganismi sono endemici.

## 1.8 DIAGNOSI

Molti dei segni clinici rilevabili in corso di leishmaniosi sono comuni anche ad altre patologie pure essere diffuse nelle zone endemiche che possono essere concomitanti con la leishmaniosi stessa. Questo fatto, oltre a complicare la diagnosi, rende ancor più difficoltosa l'applicazione di un protocollo razionale per ciò che concerne la terapia (già di per sé aspetto piuttosto delicato). Quindi gli esami di laboratorio, classificati in questo caso in specifici e aspecifici, hanno un ruolo di primaria importanza (tabella 1.4).

<b>Tabella 1.4 – Esami di laboratorio</b>	
<i>Specifici</i>	<i>Aspecifici</i>
Parassitologici	Ematologici
Midollo Cute Linfonodi	Esame emocromocitometrico
Sierologici	Ematochimici
IFAT ELISA Dot ELISA IHAT CIEP Fissazione del complemento Test all'inchiostro di china	Uremia Creatininemia ALT AST ALP VES Quadro proteico Esame delle urine Determinazione delle proteine di fase acuta Test di immunologia clinica (ANA-test; latex test; test di Coombs)

Gli **esami specifici** sono quelli più importanti, in quanto consentono di ottenere la diagnosi di leishmaniosi in maniera diretta, in modo particolare, tra le prove diagnostiche microbiologiche più recentemente messe a punto, quelle molecolari sono senza dubbio tra le più promettenti (Roura et al., 1999). Invece gli **esami aspecifici** hanno l'utilità di segnalare al diagnosta una qualche forma di sofferenza d'organo o di apparato che possa essere - direttamente o indirettamente - correlata con la leishmaniosi. Inoltre le indagini diagnostiche aspecifiche, hanno l'indubbia utilità di permettere controlli nel tempo, consentendo una duplice informazione: valutazione delle condizioni generali del paziente in senso dinamico ed apprezzamento della risposta alla terapia.

### ESAMI DI LABORATORIO ASPECIFICI

**Protidemia totale e frazionata.** Le proteine totali aumentano in maniera evidente raggiungendo valori generalmente compresi tra 8 e 14 g/dl; tale aumento è da attribuire principalmente alle beta e gamma globuline, le quali il più delle volte appaiono fuse tra loro dando

luogo ad un caratteristico ponte beta – gamma nel tracciato elettroforetico. L'iperglobulinemia che si sviluppa nel corso della malattia è il frutto dell'attivazione policlonale dei linfociti B, che producono quantità abnormi di immunoglobuline per lo più aspecifiche. Le alterazioni del profilo elettroforetico si riflettono non solo a carico delle beta e gamma globuline del tracciato, spesso è possibile rilevare anche un picco nella regione delle alfa – 2 globuline. L'aumento di tale frazione proteica può riconoscere una duplice motivazione: nella fase iniziale della malattia o nelle recidive dopo terapia, le  $\alpha$ -2 globuline possono esprimere l'aumento delle proteine della fase acuta (ceruloplasmina, alfa – 2 macroglobulina, aptoglobulina), mentre nelle fasi di cronicizzazione può essere espressione di un grave danno renale (nefrite o nefrosi), con aumento della  $\alpha$ -2 macroglobulina e delle  $\alpha$ -2- lipoproteine (VLDL).

Un'altra frequente modificazione riguarda la frazione delle albumine. Non è raro, infatti, il riscontro di una drastica caduta del picco dell'albumina; ciò è possibile conseguenza sia della compromissione renale, con perdita di albumina nel filtrato glomerulare, che di una scarsa sintesi epatica, visto il coinvolgimento pressoché costante del fegato in corso di malattia soprattutto nella sua fase cronica. In questi casi si osserva, pertanto, una inversione del rapporto albumine/globuline ed ipoproteinemia, con valori delle proteine totali inferiore a 7 g/dl.

**Esame emocromocitometrico.** L'anemia è uno dei reperti clinici più frequenti nei soggetti affetti da leishmaniosi. Il più delle volte l'anemia è di tipo normocitico-normocromico e scarsamente rigenerativa (ipoplasia midollare). La patogenesi dell'anemia è piuttosto complessa e, molto verosimilmente, multifattoriale. I fenomeni immunomediati e/o autoimmuni sembrano giocare un ruolo di particolare rilievo, così come l'aumentata attività emocateretica da parte del sistema reticolo endoteliale splenico sui globuli rossi opsonizzati dai complessi immunitari. Lo stato anemico può essere accompagnato da piastrinopenia, verosimilmente dovuta all'azione di autoanticorpi antiplastrine (Keenan et al. 1984) A differenza di quanto avviene nell'uomo, nel cane leishmaniotico non è presente leucopenia, bensì leucocitosi neutrofila (Ciaramella P. et al., 1997) per le infezioni secondarie cutanee, renali e di altri organi.

**Urea e creatinina.** Uno degli organi maggiormente coinvolti in corso di leishmaniosi, talvolta l'unico, è senza dubbio il rene. Pertanto il dosaggio sierico dell'urea e della creatinina, insieme all'esame delle urine ed al protidogramma, può fornire utili informazioni sul grado di compromissione renale, oltre ad avere un valore prognostico.

**Enzimi epatospecifici.** Il coinvolgimento epatico negli animali affetti da leishmaniosi non riveste la stessa importanza di quello renale, sebbene, in alcuni casi, il fegato rappresenti comunque un organo bersaglio, in quanto provvisto di cellule del sistema reticolo-endoteliale. I danni parenchimali, in genere non particolarmente gravi, sono espressi dall'aumento nel circolo ematico

degli enzimi transaminasi glutammico piruvica (ALT) e/o fosfatasi alcalina (ALP) che, dopo adeguata terapia, tendono a normalizzarsi.

**Velocità di eritro-sedimentazione (VES).** L'aumento della VES nella leishmaniosi è un dato pressoché costante. Dipende da vari fattori ma soprattutto dall'anemia, dall'aumento delle gammaglobuline e del fibrinogeno, dalla presenza di immunocomplessi e dalla riduzione della quota albuminica, tutti fattori che contribuiscono all'aggregazione e alla formazione di rouleaux dei globuli rossi.

**Esame delle urine.** La principale alterazione che si evidenzia all'esame delle urine di cani leishmaniotici con lesioni renali è la proteinuria,

I test semiquantitativi impiegati nelle ricerche di screening per rilevare la presenza di proteine nelle urine sono molto sensibili, ma sono influenzati dalla concentrazione e dal volume delle urine stesse. Per questo motivo o è diventato routinario l'utilizzo del rapporto Pu/Cu per rilevare e quantificare i casi di proteinuria significativa nei campioni di urina raccolti secondo il criterio della casualità.

Il rapporto Pu/Cu dei singoli campioni di urina prelevati casualmente, risulta correlato in modo eccellente con il contenuto proteico dei campioni di urine nell'arco di 24 ore da cani normali o colpiti da disfunzioni glomerulari (Grauer et al AmJ Vet RES 1985).

Sulla base dell'extrapolazione dei dati relativi alle proteine escrete dai cani sani e da studi in cui la valutazione del rapporto Pu/Cu è contemporanea alla biopsia e valutazione istologica del danno renale, sono stati stabiliti i seguenti criteri:

Pu/Cu < 0,5	NORMALE
0,5 < Pu/Cu < 1	DUBBIO
Pu/Cu > 1	PATOLOGICO

La proteinuria è un segno precoce di glomerulopatia che potendosi rilevare prima dell'innalzamento dei valori della creatinina e dell'urea, ed è anche proporzionale al danno renale, associato o meno alle alterazioni dell'esame del sedimento urinario (di cilindri in genere granulosi o cerei).

La tipizzazione delle proteinurie è effettuata mediante metodiche di frazionamento delle proteine con SDS-PAGE e SDS-AGE che consentono di differenziare le proteine in base al loro peso molecolare. L'escrezione di proteine ad alto peso molecolare (60-70000 d) è correlata ad un danno prevalentemente glomerulare, mentre il rilievo di proteine a basso peso molecolare è espressione di compromissione tubulare.

In corso di Leishmaniosi canina il danno renale è, in genere, grave e la proteinuria è di tipo misto (glomerulare e tubulare); se la compromissione renale è minore la proteinuria è di tipo selettivo, più frequentemente glomerulare.

## **ESAMI DI LABORATORIO SPECIFICI**

**Esami parassitologici.** Hanno lo scopo di mettere in evidenza il parassita (sotto forma di amastigote) in organi e tessuti animali o in coltura. Sono metodiche molto specifiche in quanto si basano sull'osservazione diretta del parassita, ma poco sensibili per la possibilità di diagnosticare falsi negativi. L'impiego di anticorpi monoclonali e delle tecniche di immunoistochimica, permette l'identificazione selettiva dei parassiti anche in campioni con pochi parassiti, aumentando quindi la sensibilità di questi metodi.

L'identificazione diretta degli amastigoti all'interno del citoplasma dei macrofagi o liberi viene eseguita su strisci ottenuti da ago-aspirato linfonodale (in genere linfonodi prescapolari e poplitei), midollare, biopsia cutanea, impressione diretta o per raschiamento di ulcere e granulomi. La maggior parte degli Autori ritiene che vi sia una correlazione diretta tra la gravità del quadro clinico ed il numero di parassiti che si rinviene nello striscio.

Dalle stesse sedi possono essere effettuati prelievi per l'esame colturale che viene eseguito tramite la semina del campione su un substrato colturale adeguato, generalmente terreno di Tobie modificato da Evans. La crescita dei promastigoti avviene in 3-5 giorni o a volte in due-tre settimane.

**Diagnostica molecolare.** Tra le prove diagnostiche microbiologiche più recentemente messe a punto, quelle molecolari sono senza dubbio tra le più promettenti (Roura et al., 1999). Le sonde molecolari e la "polymerase chain reaction"(PCR) permettono, infatti, il ritrovamento di un numero estremamente esiguo di microrganismi o di frammenti del loro materiale genetico e l'identificazione di tratti genomici specifici di un determinato microrganismo. Le sonde molecolari vengono utilizzate per l'ibridazione del genoma di uno specifico microrganismo in campioni biologici fissati su vetrino. La PCR permette, invece, l'amplificazione del DNA-target che identifica il microrganismo in esame, attraverso l'uso di "primer" specifici che si legano a tratti del genoma in esame, permettendo la duplicazione e l'amplificazione a catena di un'unica o di pochissime specifiche sequenze genomiche presenti in qualsiasi tipo di campione.

La PCR è stata testata con successo su diversi campioni biologici di cani affetti da leishmaniosi (sangue, linfonodi, cute, midollo, tamponi congiuntivali), mostrandosi altamente specifica ma non altrettanto sensibile. Il limite della tecnica è rappresentato dalla possibile contaminazione del campione che può dare origine a falsi positivi e dal fatto che il test possa

risultare positivo anche in seguito ad ipotetica sterilizzazione dopo terapia, in quanto i frammenti molecolari del genoma, dopo la distruzione dei parassiti, possono permanere per molto tempo nell'organismo animale.

La Nested PCR (N-PCR) consente di aumentare la specificità della procedura diagnostica in quanto si eseguono 2 amplificazioni successive, utilizzando nel secondo-esperimento una coppia di nucleotidi interni rispetto ai precedenti, che producono un frammento di amplificazione di dimensioni inferiori ma, ovviamente, possono funzionare soltanto se il risultato della prima amplificazione è specifico.

**Esami sierologici.** Sono i test maggiormente utilizzati per la diagnosi ed il controllo della leishmaniosi canina. Si basano sull'identificazione degli anticorpi specifici anti-Leishmania circolanti. Questi metodi sono altamente sensibili e specifici, ma comunque non possono essere utilizzati come unico test diagnostico, poiché possono risultare falsamente positivi in quei cani resistenti o sani che sono venuti a contatto precedentemente con il parassita, e falsamente negativi in soggetti che, infettati di recente, non hanno ancora prodotto una risposta anticorpale rilevabile.

**IFAT- Immunofluorescenza indiretta.** È il test più largamente utilizzato, si basa sull'evidenziazione di anticorpi specifici nel siero del soggetto in esame (Dye C. et al., 1993). Questo test, pur presentando dei limiti oggettivi, legati alla soggettività della lettura, alla variabilità dell'antigene fissato sui vetrini e alla scarsa affidabilità per i titoli bassi (false positività e false negatività), continua a costituire ancora oggi l'esame più impiegato per la diagnosi della malattia.

<b>Tabella n°1.5- Interpretazione dei risultati dell'IFAT</b>	
<b>Titolo</b>	<b>Risultato</b>
<b>&gt; 1/160</b>	Positivo
1/40-1/80	Dubbio

La risposta viene espressa in titoli anticorpali (tab1.5) di diluizione; il valore soglia per il sospetto di uno stato di infezione nel cane è considerato 1/40, mentre viene considerato positivo un titolo sierologico uguale o superiore a 1/160. Deve essere comunque sottolineato che non c'è sempre una proporzionalità diretta tra titolo sierologico e gravità della malattia, e ancora tra titolo sierologico e tasso di immunoglobuline, messe in evidenza dall'esame elettroforetico. La valutazione del titolo anticorpale, come marker nel monitoraggio della terapia, risulta pertanto di scarso significato. Un aiuto in tal senso può derivare non tanto dalla modificazione del titolo sierologico in corso di terapia, quanto dalla sua negativizzazione al termine dei diversi cicli terapeutici e, anche, dalla ricomparsa di sieroconversione, indice precoce di malattia.

**ELISA** - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. Si tratta di un test immunoenzimatico che utilizza antigeni solubili adsorbiti su piastre. La formazione del complesso antigene-anticorpo viene evidenziata mediante l'aggiunta di una antiglobulina di cane coniugata con un enzima che, in caso di positività, rivela una reazione colorimetrica che viene letta da uno spettrofotometro. Poiché l'antigene è rappresentato da un estratto proteico crudo di parassiti in coltura, costituito dall'insieme di tutti gli antigeni proteici del parassita, l'affidabilità del test immunoenzimatico non è alta, a causa delle possibili risposte aspecifiche. Per questo motivo recentemente, nell'intento di ottimizzare la metodica, l'antigene crudo è stato sostituito da un antigene ricombinante, denominato K39 (Burns Jm. Et al., 1993), che ha dimostrato di possedere elevata specificità e sensibilità.

Sovrapponibile alla tecnica ELISA è quella della DOT ELISA, che utilizza promastigoti interi fissati su un supporto in nitrocellulosa e collocati sul fondo di micropiastre; la reazione si svolge come una normale ELISA ma per la lettura non è necessario lo spettrofotometro. I vantaggi rispetto all'Elisa tradizionale sono numerosi: è più rapida, richiede minori quantità di antigene, la lettura non è influenzata da sieri emolitici o lipemici.

**Western-Blot**. Si basa sulla migrazione elettroforetica delle proteine antigeniche, separate su un gel di poliacrilamide, su di un supporto di cellulosa. E' utile in presenza di un basso titolo anticorpale ai test Ifat ed Elisa e può essere utilizzata come test di conferma. E' una tecnica molto sensibile e specifica ma riservata ai laboratori specializzati in immunologia.

**Test intradermico** (*Skin test o reazione di Montenegro*). Valuta la risposta immunitaria cutanea ritardata, quindi cellulo-mediata, all'inoculazione intradermica dell'antigene leishmania. Nei cani resistenti, che sviluppano una risposta prevalentemente Th1, questo test risulta positivo, con la comparsa di un nodulo cutaneo più o meno grande; nei soggetti sensibili, che sviluppano una risposta prevalentemente Th2, il test sarà negativo. Lo skin test assume quindi valore prognostico nei confronti della malattia. E' un test con buona sensibilità, ma non altamente specifico ed inoltre è di difficile realizzazione per la notevole difficoltà di reperire l'antigene sul mercato (Moody AH., et al., 1996).

**Test di stimolazione linfocitaria** .E' prova della trasformazione consente di valutare l'immunità di tipo cellulo-mediata e quindi l'eventuale rilievo di deficit immunologici sia genetici che acquisiti. L'esposizione di linfociti T ad un antigene, verso cui sono sensibilizzati, determina la loro trasformazione in cellule blastiche, cui si accompagna una serie di modificazioni morfologiche, biochimiche e biologiche. Questa attivazione può essere messa in evidenza valutando in esse l'aumento della sintesi del DNA, attraverso la misurazione dell'incorporazione di suoi precursori marcati radioattivamente (in genere timidina triziata o 5-bromo-2'- desossiuridina ). Maggiore è la reattività delle cellule all'antigene, maggiore sarà la loro reattività al termine della prova. Il rapporto

tra la radioattività delle colture stimolate e la radioattività delle colture di controllo (non stimolate dall'antigene o dal mitogeno) viene denominato 'indice di blastizzazione o di stimolazione'. Questo fenomeno viene indotto anche in modo aspecifico da vari mitogeni quali la fitoemoagglutinina, e la concanavalina A (ConA). E' opportuno sottolineare che i mitogeni non specifici, che si impiegano cioè per valutare la funzionalità linfocitaria, sono di solito in grado di trasformare circa il 60-90% dei linfociti dei soggetti sani.

Gli antigeni specifici sono capaci di stimolare solo il clone in grado di riconoscerli e quindi sono necessari alcuni giorni di incubazione (2-5), affinché i linfociti sensibilizzati all'antigene vadano incontro a divisioni successive e a trasformazioni tali da fornire una risposta apprezzabile. (Poli et Cocilovo 1996).

**Determinazione di linfocine.** Nel modello murino è possibile distinguere in maniera netta i soggetti in relazione alla risposta immunitaria nei confronti di *Leishmania infantum*:

- soggetti Th1, nei quali prevale la risposta immunitaria cellulo-mediata con produzione di alti livelli IL-2 e IFN $\gamma$ ;

- soggetti Th2, nei quali prevale la risposta immunitaria di tipo anticorpale, non protettiva, caratterizzata da alti livelli di IL-4, 5, 6, 10 e 13. Da ciò l' esigenza di approfondire la conoscenza del pattern di citochine prodotte dal cane in corso di malattia al fine di poter ottenere dati predittivi sull'evoluzione della stessa. In genere il profilo delle citochine prodotte viene determinato indirettamente con l'utilizzo di una *reverse transcriptase* PCR, una metodica che consente di evidenziare e semiquantificare l'mRNA che codifica le varie citochine, Si tratta comunque di una misurazione indiretta, ma di sicuro il futuro impiego di tecniche innovative (real time PCR ) consentirà di completare il quadro di informazioni in nostro possesso

## 1.9 TERAPIA

Le *Leishmanie* raramente vengono eliminate completamente dall'organismo di un soggetto infetto con i farmaci attualmente disponibili. Le recidive che richiedono il trattamento sono la regola piuttosto che l'eccezione, per quanto alcuni cani possono infine diventare clinicamente sani.

---

"Le *Leishmanie* raramente vengono eliminate con i farmaci attualmente disponibili"

Prima di iniziare la terapia va valutato lo stato ematologico e soprattutto epato-renale; nei soggetti con stato avanzato di insufficienza epatica e/o renale la terapia può risultare inutile o addirittura controproducente. Il grado di compromissione clinica dell'animale, valutato bene, permette di ipotizzare il grado di efficacia della terapia; dati sperimentali hanno dimostrato che esiste un rapporto di proporzionalità inversa tra l'entità delle manifestazioni cliniche e l'efficacia dei farmaci.

Tradizionalmente il trattamento della leishmaniosi canina prevede l'uso di antimoniali pentavalenti ( $Sb^{5+}$ ) quali il meglumine antimoniato e lo stibogluconato di sodio, che inibiscono selettivamente gli enzimi protozoari necessari per l'ossidazione glicolitica e degli acidi grassi. È preferibile somministrare questi farmaci per via SC perché, le iniezioni in muscolo nella coscia possono determinare grave zoppia a causa di una fibrosi muscolare, mentre le iniezioni in IV possono causare tromboflebite (Koutinas et al., 1999; Slappendel and Ferrer, 1997). Inoltre, in alcuni cani, il trattamento con gli antimoniali sembra alterare lo stato immunologico del paziente senza ottenere una guarigione definitiva a causa dello sviluppo di noduli dermici granulomatosi (Peters et al., 1987).

Altro farmaco usato dai veterinari nell'area del Mediterraneo, specialmente in combinazione con lo  $Sb^{5+}$ , è l'allopurinolo che, incorporato nell'RNA del parassita, ne inibisce la moltiplicazione (Alvar et al., 1994; Murray, 1990; Sundor et al., 1994). Questo farmaco è meno costoso dei precedenti, può essere dato per via orale ed ha pochi effetti collaterali, tra i quali, l'iperxanturia (controllata con la somministrazione di una dieta a basso tenore di proteine) che può produrre urolitiasi (Bartges et al., 1995).

La terapia combinata antimoniali pentavalenti/allopurinolo, e il sinergismo di questi farmaci nel produrre la remissione clinica sono riportati in letteratura (Martinez et al., 1988; Denerolle and Bourdoiseau, 1999). Un singolo ciclo con il meglumine antimoniato, alla dose di 100 mg/Kg per 30 giorni, in combinazione con allopurinolo (10 mg/kg ogni 8 ore, oppure 20 mg/kg ogni 12 ore) è raccomandata per la fase di induzione della terapia. L'allopurinolo deve essere continuato per la fase di mantenimento. Questa combinazione ha il vantaggio di ridurre la durata della terapia con il

meglumine antimoniale e, inoltre, riduce le possibilità di recidive dopo la sospensione dell'antimoniale (Denerolle and Bourdoiseau, 1999).

Anche gli agenti antimicrobici, specialmente l'amfotericina B, il ketoconazolo, e l'itraconazolo o altri farmaci antiprotozoari come il diminazene, sono stati utilizzati con successo variabile (Lamothe, 1997; Oliva et al., 1995; Poli et al., 1997), ma le segnalazioni sui loro effetti sono aneddotiche.

In modo particolare, l'amfotericina B lipo-associata è efficace nel trattamento delle persone con leishmaniosi viscerale resistente agli antimoniali (Barman, 1997); allo stato attuale questo è il trattamento d'elezione per la leishmaniosi umana in Italia. I cani trattati con tale farmaco mostrano un miglioramento clinico senza eliminazione completa del parassita (Oliva et al., 1995).

L'aminosidina, un aminoglicoside, ha mostrato, confrontata in alcune prove preliminari agli antimoniali pentavalenti, una certa efficacia nel trattare i cani con infezione da *L.infantum* (Poli et al., 1997). L'inconveniente principale è legato alla nefrotossicità del composto; poiché molti cani leishmaniotici mostrano un coinvolgimento renale di vario grado, nella pratica clinica il farmaco è poco utilizzato.

I glicocorticoidi vengono spesso utilizzati nel tentativo di controllare i fenomeni immunopatologici [prednisone e prednisolone a dosi non immunosoppressive (1-2 mg/kg al giorno per 40 gg) anche se probabilmente tali dosi danno buoni risultati più per le proprietà antiflogistiche che per l'inibizione della produzione anticorpale. Tali farmaci devono essere usati con moderazione e cautela, per non correre il rischio, paradossalmente, di aggravare la funzionalità renale: per la loro azione catabolica, per l'induzione di ipoalbuminemia, e per le stesse proprietà immunosoppressive (inibiscono la produzione di IL1 dai monociti attivati ed ostacolano quella di IL2 dai linfocitiT helper). Le lesioni cutanee in corso di leishmaniosi possono migliorare con la somministrazione di prednisolone, ma la carica parassitaria può risultare aumentata (Rüfenacht et al., 2005). Nei topi sperimentalmente infetti e trattati per lunghi periodi di tempo con desametasone, si ha un incremento della carica parassitaria nella milza (Gangneux et al., 1999). Nel cane, inoltre (come nell'uomo e nel topo), l'immunità cellulo-mediata è d'importanza fondamentale nel controllo della leishmaniosi (Moreno et al., 2002), ed i glicocorticoidi determinano un'inibizione di tale immunità, influenzando l'equilibrio ospite-parassita.

La pentamidina è un composto diamminico considerato fino a pochi anni fa, soprattutto in Francia, il farmaco di elezione nella terapia di alcune forme di leishmaniosi cutanea e mucocutanea dell'uomo ma anche di alcune forme di tripanosomiasi, per la sua buona attività antiprotozoaria e antifungina. Il suo meccanismo d'azione è poco conosciuto, sebbene sia dimostrato che la pentamidina è in grado di causare danni al DNA del kinetoplasto ed al complesso mitocondriale dei

parassiti. Analogamente agli altri composti diamminici, la pentamidina è un farmaco capace di indurre numerosi effetti collaterali acuti (ipotensione, nausea, vomito, scialorrea, diarrea, shock anafilattico) e cronici (ipoglicemia, diabete, danni epato-renali, trombocitopenia). Inoltre la pentamidina isotionato, il sale normalmente presente nelle preparazioni commerciali, somministrata per via intramuscolare risulta fortemente istolesiva, tanto da provocare la formazione di ascessi nel punto di inoculazione. Nel cane è utilizzata in alternativa, e più frequentemente in associazione, agli antimoniali pur non esistendo un effetto sinergico tra i due farmaci.

Le dosi suggerite sono di 4 mg/kg a giorni alterni, per un periodo di 3-4 settimane (Euzeby, 1982); quando adoperata in associazione ad antimonio di N-metilglucamina, viene somministrata un giorno la pentamidina ed un giorno il composto antimoniale per 24-30 giorni.

Anche nel cane, nonostante la buona efficacia anti-leishmania della pentamidina, vengono segnalati gli stessi gravi effetti riportati per l'uomo.

La Miltefosina (esadecil-fosfocolina) è un analogo dei fosfolipidi, composto da esteri con diverse catene lunghe sature ed insature di gruppi alchilici e la sua attività anti-*Leishmania* è determinata da alterazioni indotte al metabolismo dei fosfolipidi del parassita. La dose attualmente registrata nel cane è di 2 mg/kg una volta al giorno per os per 28 giorni. Il farmaco ha un assorbimento rapido e completo, una bassa clearance plasmatica, una lunga emivita nei tessuti corporei, un'ampia distribuzione nei tessuti bersaglio, una lenta metabolizzazione epatica in colina e l'assenza di eliminazione per via renale. La combinazione tra la miltefosina e l'allopurinolo ha fornito risultati clinici e parassitologici del tutto sovrapponibili a quelli solitamente dimostrati dalla combinazione tra gli antimoniali e l'allopurinolo (Mirò et al., 2009). A causa della sua tossicità sull'apparato riproduttore non dovrebbe essere somministrata a cagne gravide, in lattazione e destinate alla riproduzione (Oliva et al., 2010).

## 1.10 PREVENZIONE

In attesa di studi scientifici che dimostrino l'efficacia dei protocolli terapeutici usati, in medicina umana o negli animali da laboratorio, è bene non utilizzare farmaci la cui efficacia è dubbia o aneddotica. Fino a quando non saranno disponibili farmaci ad azione leishmanicida e/o immunomodulante, dovremo controllare la leishmaniosi con un'azione preventiva. La prevenzione è tesa ad evitare sia l'infezione che la re-infezione di soggetti già infetti, evitando, in quest'ultimo caso, che cani leishmaniotici, anche se clinicamente guariti a seguito di terapia, continuino ad essere serbatoio per i vettori della leishmaniosi. Il fine ultimo è quello di ottenere un controllo della leishmaniosi mediante la prevenzione di "massa". Durante le ore notturne dei mesi caldi, a partire dall'imbrunire fino al sorgere del sole, gli animali infetti e/o malati possono essere tenuti in rifugi chiusi, dove porte e finestre sono state protette da "zanzariere" a maglia fitta (1-2 mm), tali da impedire l'ingresso dei flebotomi. Oltre a questo tipo di prevenzione (prevenzione meccanica) gli animali possono essere trattati con farmaci repellenti (protezione chimica) in grado di evitare o ridurre il contatto del cane con l'agente vettore. Tra le varie sostanze chimiche sperimentate i piretroidi sintetici, somministrati in varie forme (collare, spray, spot-on), sono le sostanze ad uso veterinario con efficacia provata sui vettori di leishmaniosi (Maroli et al., 2009).

**"In mancanza di farmaci ad azione leishmanicida, la lotta alla leishmaniosi si basa sulla prevenzione"**

## **CAPITOLO 2**

### **2.1 INTRODUZIONE**

*In* questi ultimi anni il tumultuoso sviluppo delle tecnologie biomediche ha consentito la messa a punto di nuove strategie vaccinali, garantendo una maggiore efficienza nel prevenire malattie dell'uomo e degli animali e riducendo nel contempo indesiderati effetti collaterali (Cavirani e Martelli, 2003). Tuttavia la natura di molti agenti infettivi è tale da permettere agli stessi di aggirare le difese immunitarie naturali ed indotte (dai vaccini) dell'ospite, per cui ancora molta strada deve essere fatta per garantire la protezione immunitaria a fronte di numerose malattie dell'uomo e degli animali domestici (Cavirani e Martelli, 2003).

## 2.2 LA VACCINAZIONE: CONCETTI GENERALI

La vaccinazione consiste nella presentazione al sistema immunitario di un agente infettivo (completo o incompleto, attenuato o inattivato) al fine di indurre una risposta immunitaria (umorale e/o cellulare) capace di contrastare specificamente una malattia infettiva (Cavirani e Martelli, 2003), (Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, *sanidadanimal.info*). Allo stato attuale è possibile suddividere i vaccini in due grandi categorie: a) vaccini convenzionali, b) vaccini di nuova generazione. I vaccini convenzionali, ancora i più largamente utilizzati, vengono a loro volta distinti in vaccini inattivati e vaccini vivi attenuati. Quanto ai vaccini di nuova generazione, si possono distinguere: a) vaccini costituiti da proteine inattivate, b) vaccini vivi deleti, c) vaccini vivi ricombinati geneticamente, d) vaccini di DNA. Da considerare che esistono anche altri sistemi di classificazione dei vaccini. Ad esempio, alcuni autori suddividono i vaccini in tre generazioni: a) vaccini di prima generazione (vaccini convenzionali), b) vaccini di seconda generazione (vaccini deleti, vaccini ricombinanti vivi, vaccini basati su antigeni purificati) e vaccini di terza generazione (vaccini a DNA). In ogni caso, trattasi esclusivamente di diversi metodi di raggruppamento degli stessi vaccini.

## 2.3 VACCINI CONVENZIONALI

### 2.3.1 Vaccini inattivati

I vaccini inattivati sono formati da microrganismi completi inattivati con metodo fisico (es., calore) o chimico (ad es., formaldeide e agenti chelanti come ossido di etilene, propionolattone, etilenamina, ecc) in maniera tale da non modificare le molecole proteiche responsabili della stimolazione dell'immunità nell'ospite. Rispetto ai vaccini vivi attenuati (vedi apposito paragrafo) hanno una maggiore stabilità e sicurezza (non replicano nel soggetto trattato ed hanno scarsi effetti collaterali), inoltre sono più facilmente conservabili. Di contro, inducono, solitamente, una risposta immunitaria minore rispetto ai vaccini attenuati, fondamentalmente legata ai linfociti CD 4+ con produzione di anticorpi.

Sono stati i primi vaccini anti-*Leishmania* messi a punto (Poli, 1988).

### 2.3.2 Vaccini vivi attenuati

Sono ottenuti utilizzando un agente infettivo omologo a quello che determina malattia, ma la cui virulenza sia stata attenuata, in modo da indurre immunità duratura contro l'agente omologo virulento senza produrre lesioni secondarie nell'animale. Il sistema di attenuazione più utilizzato consiste nel realizzare un gran numero di passaggi del virus o del batterio virulento in linee cellulari (virus) o terreni di coltura (batteri), in modo che i microrganismi perdano la loro virulenza e non producano lesioni all'animale, ma continuino ad avere la capacità di replicarsi o moltiplicarsi sufficientemente così da poter essere processati dal sistema immunitario ([http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun\\_it/octavo2.htm](http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun_it/octavo2.htm)) Il maggiore vantaggio di questi vaccini è la capacità del microrganismo di replicare e di attivare tutte le fasi della risposta immunitaria, sia umorale che cellulo-mediata (Poli 1988). Il principale problema di questo tipo di vaccini è che l'attenuazione può non essere stabile, e si possa così ritornare a forme virulente ([http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun\\_it/octavo2.htm](http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun_it/octavo2.htm)).

## 2.4 VACCINI DI NUOVA GENERAZIONE

### 2.4.1 Vaccini di subunità e vaccini sintetici

Questi vaccini sono costituiti da una proteina o da più proteine di un agente infettivo che sono in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva simile a quella stimolata dall'agente infettivo completo. Tramite tecniche di ingegneria genetica si possono selezionare i geni corrispondenti alle proteine, clonarli e farli esprimere in vettori diversi (vaccini di sub unità). Una variante di questo sistema consiste, una volta identificata la proteina di interesse immunologico, nell'ottenere la o le proteine per sintesi proteica (vaccini sintetici). Nel primo caso, identificata la proteina di interesse immunologico di un determinato agente e la sua sequenza, è possibile isolare il frammento di DNA che codifica la suddetta proteina e inserirlo in un plasmide che funge da vettore di trasferimento. Il plasmide veicolerà il gene in un vettore di espressione che, se accetterà il nuovo gene, inizierà la produzione della relativa proteina. I vettori di espressione maggiormente utilizzati sono i batteri (principalmente *E. coli*), i lieviti e i baculovirus. Esistono diversi sistemi di marcatura che permettono di differenziare il vettore che esprime il nuovo gene da quello che non lo ha incorporato.

Questi vaccini presentano una risposta simile a quella indotta dai vaccini inattivati convenzionali, ma sono, generalmente, antigenicamente meno attivi (richiedono una maggiore quantità di antigene per indurre risposte analoghe). Questo problema dovrà trovare soluzione nell'impiego di adiuvanti altamente tecnologici (Cavirani e Martelli, 2003). Tuttavia presentano il vantaggio di non essere formati da tutta la struttura dell'agente infettivo, permettendo di differenziare siero logicamente i soggetti vaccinati da quelli infetti.

### 2.4.2 Vaccini vivi deleti

Un'altra strategia vaccinale, resa possibile dallo sviluppo delle moderne biotecnologie, consiste nella possibilità di modificare la struttura genomica di alcuni microrganismi, privandoli dei geni che codificano proteine collegate alla virulenza ed ottenendo così ceppi attenuati in maniera stabile e sicura. I microrganismi così modificati saranno incapaci di replicare e/o persistere, determinando delle infezioni abortive, autolimitanti, comunque capaci di stimolare la risposta immunitaria (Mohebbali et al., 2004). Da un'oculata scelta delle proteine da 'eliminare', è possibile rendere gli animali vaccinati riconoscibili da quelli naturalmente infetti. Infatti, gli animali infetti

presenteranno anticorpi assenti negli animali vaccinati, perché diretti contro proteine delete nei virus utilizzati a scopo vaccinale.

### ***2.4.3 Vaccini ricombinanti vivi***

I vaccini ricombinanti vivi sono basati sull'utilizzo di un microrganismo (virus o batterio) che funge da vettore per far esprimere geni di un microrganismo diverso. In questo modo il nuovo microrganismo ricombinante può essere utilizzato come vaccino contro entrambi.

Sia i vaccini vivi deleti che i vaccini ricombinanti vivi, inducono una risposta immunitaria simile a quella dei vaccini vivi attenuati convenzionali, ma con il grosso vantaggio di permettere la differenziazione animali vaccinati/animali infetti.

### ***2.4.4 Vaccini a DNA***

Nel caso di questi vaccini una frazione purificata di DNA, contenente il gene della proteina capace di indurre una risposta immunitaria protettiva, viene inserita in un plasmide che funge da vettore per trasportare questo gene direttamente nelle cellule dell'ospite vaccinato. Saranno quindi le cellule dello stesso ospite a produrre la proteina capace di stimolare il sistema immunitario, in maniera non troppo dissimile da come avviene durante un'infezione naturale.

L'efficacia dei vaccini a DNA è considerata molto buona, sia a livello umorale che cellulare. Inoltre, questi vaccini a differenza dei vaccini ricombinanti risultano molto più stabili, di più basso costo, non necessitano della catena del freddo per la distribuzione e mostrano una maggiore flessibilità di combinazione di geni multipli in un semplice costrutto (Clarisa e Palatnik, 2008).

### ***2.4.5 Conclusioni***

Concludendo, i vantaggi offerti dai vaccini di nuova generazione, rispetto ai vaccini convenzionali, si possono riassumere in tre punti: a) **maggiore sicurezza**, non pongono i problemi di inattivazione. Nel caso dei vaccini convenzionali, il rischio di una inattivazione non efficiente sta nella possibile reversione allo stato virulento. b) i vaccini a subunità o sintetici presentano **minori esigenze della catena del freddo** rispetto ai vaccini convenzionali. c) **possibilità di differenziare** gli animali vaccinati dagli animali malati.

## 2.5 SVILUPPO, REGISTRAZIONE, PRODUZIONE DEI VACCINI

In questo paragrafo viene fatto un breve cenno sulla tempistica di sperimentazione utile per comprendere a quale fase siano le molecole anti-*Leishmania* in studio allo stato attuale, ma anche per comprendere le diverse problematiche che uno studio incontra per arrivare a registrare un vaccino, senza trascurare la difficoltà nell'elaborare una molecola in grado di stimolare una risposta immunitaria protettiva nei confronti di un agente eziologico. Prima della sperimentazione clinica nell'animale target, qualsiasi farmaco o vaccino deve essere testato in vitro o in animali da laboratorio in modo da dimostrare la sua attività nei confronti del patogeno in esame, per accertarne la tossicità e la tollerabilità. La sperimentazione clinica passa attraverso quattro fasi (I, II, III, IV). Lo scopo della fase I è quello di dare una prima valutazione sulla sicurezza del farmaco negli animali a cui esso è destinato e allo stesso tempo studiarne la cinetica ed eventuali reazioni avverse (WHO, 1997). Infatti numerosi possono essere i rischi causati dalla somministrazione di un vaccino e di questi rischi si deve tener conto nello sviluppare una molecola. Ad esempio, è possibile che un vaccino esacerbi la malattia associata con l'infezione (Hoskins et al., 1979.) o causi reazioni patologiche dovute a reattività crociata tra gli antigeni dell'ospite e quelli del parassita. Un altro rischio è quello di scatenare la malattia verso la quale si vaccina per via di un'inattivazione o attenuazione inefficaci dell'agente patogeno. C'è anche la possibilità che un microrganismo attenuato possa causare malattia in individui immunocompromessi (Handman, 2001).

Accertato che il farmaco non sia tossico, o che perlomeno abbia una tossicità accettabile, si passa alla fase II. In questa fase, su un numero limitato di soggetti, si valuta l'efficacia immunologica del vaccino. Più precisamente, ad un preciso dosaggio e con una definita somministrazione, viene misurata la risposta immunitaria che per i vaccini anti-*Leishmania* è quella mediata dai linfociti T. Se dalla fase II si ottengono risultati soddisfacenti, si passa alla fase III nella quale il farmaco viene somministrato ad un numero più ampio di soggetti. Per la maggior parte, gli studi di fase III sono di tipo randomizzato e in doppio cieco e la durata è variabile a seconda degli obiettivi che la sperimentazione stessa si pone. L'importanza dei dati ottenuti in questa fase è amplificata dall'elevato numero di soggetti coinvolti, spesso diversi per età, razza e sesso. (WHO, 1997). Al termine di questa fase, il prodotto ottiene l'autorizzazione per la commercializzazione.

## 2.6 PROBLEMATICHE NELLA PRODUZIONE DI VACCINI ANTI-LEISHMANIA

**Prima** di passare alla descrizione delle molecole sperimentate anti-Leishmania è opportuno soffermarsi a valutare i problemi che rendono difficoltosa l'elaborazione di una molecola vaccinale che sia in grado di proteggere il cane da questa insidiosa malattia.

La letteratura è ricca di studi volti a sperimentare sostanze che possano stimolare nel cane una risposta immunitaria protettiva. Uno degli ostacoli più importanti nel raggiungimento di questo obiettivo è insito nella complessa organizzazione genomica di Leishmania in grado, sotto condizioni di stress o in seguito a contatto con farmaci, di modificarsi e divenire resistente. Quindi una prima difficoltà sta proprio nell'identificare una molecola che sia in grado di stimolare una risposta immunitaria protettiva (Th1) in grado di bypassare i meccanismi di difesa che Leishmania mette in atto.

Un altro problema risiede nel fatto che la gran parte degli studi sono stati effettuati in animali da laboratorio (topo e ratto) e come è stato dimostrato da diversi lavori, molecole che hanno dato ottimi risultati in queste specie (fase I e II) testate sul cane, in fase III, non davano gli stessi risultati (Oliva et al., 2010). Quindi il topo ed il ratto utilizzati nella fase di ricerca pre-clinica, non possono essere considerati modelli sperimentali validi per il cane e per l'uomo (Oliva, 2010). Diversamente è probabile che il cane possa essere un buon modello sperimentale per l'uomo in quanto la malattia si riproduce approssimativamente allo stesso modo nelle due specie (Garg et Dube, 2006). Handman in un lavoro pubblicato nel 2001 sostiene che da dati ottenuti utilizzando diversi ceppi murini, si evince che le variazioni genetiche dell'ospite hanno la maggiore influenza nel determinare l'esito dell'infezione. Parte di queste variazioni probabilmente riflettono differenze nell'abilità dell'ospite nel rispondere ai singoli antigeni. Un individuo può presentare un'elevata risposta ad un antigene ed una risposta molto bassa ad un altro. Di conseguenza, un vaccino da utilizzare in una popolazione mista, come quella degli esseri umani, richiederà probabilmente parecchi antigeni diversi per garantire una risposta soddisfacente dalla maggior parte, se non da tutta, la popolazione. Ciò potrebbe valere anche per specie diverse dal murino come il cane o il gatto.

Passando alle prove previste nella fase propriamente clinica, per poter sperimentare l'efficacia di un vaccino anti-Leishmania, è necessario utilizzare un modello di studio che preveda l'infezione naturale nella fase III. È noto infatti che l'infezione sperimentale dei cani assume forme e decorsi molto spesso differenti da quanto avviene in natura (Oliva et al., 2010). Questa

particolarità rende necessaria una precisa definizione dell'obiettivo che ci si propone di valutare: deve un vaccino per la Leishmaniosi canina prevenire l'attecchimento dell'infezione oppure lo sviluppo di malattia?

Quindi tenendo conto di ciò e del fatto che è possibile una negativizzazione spontanea dell'infezione in periodi variabili da pochi mesi ad anni (Oliva et al., 2006), i due obiettivi connessi tra di loro, però necessitano di tempistiche di studio differenti. Per questi motivi afferma che uno studio che preveda l'infezione naturale dei soggetti esposti, dovrebbe durare almeno 2-3-anni, periodo di tempo considerato necessario al rilievo dell'attecchimento definitivo dell'infezione, oppure 3-4 anni, necessari per il rilievo dell'evoluzione dell'infezione verso la malattia (Gradoni et al., 2001).

Essendo lo scopo di una profilassi vaccinale proteggere cani non infetti, ossia cani in cui non è dimostrabile la presenza di parassita, i cani per uno studio vaccinale dovrebbero essere scelti in virtù della loro negatività all'infezione. Nelle zone endemiche teoricamente la maggior parte dei cani (60-70 %) (Solano-Gallego et al., 2009) può risultare già infetta pur non presentando nessun segno clinico e spesso in assenza di anticorpi specifici, quindi la situazione più vantaggiosa sarebbe quella di introdurre in un focolaio endemico precedentemente selezionato, cani provenienti da zone sicuramente non endemiche. Inoltre, altri fattori che potrebbero contribuire alla riuscita di un trial clinico sono: la scelta del numero dei soggetti e il follow up degli stessi. In considerazione della necessità di avere un gruppo controllo (soggetti non vaccinati) perfettamente omogeneo a quello dei cani sottoposti a vaccinazione e della possibile perdita di cani per cause diverse dalla leishmaniosi, i due gruppi di cani dovrebbero essere composti da almeno 30 unità per gruppo ai fini di una corretta valutazione statistica, presupponendo una efficacia del vaccino pari al 70-80%. Il follow up dei cani prevede dei controlli periodici, rivolti anche alla diagnosi di malattie diverse dalla leishmania, considerando che, durante la prova di campo, i cani non devono essere trattati con gli antiparassitari e altri farmaci usualmente utilizzati per proteggere il cane da malattie trasmesse da vettori (*Ehrlichia*, *Babesia*, *Hepatozoon*, filarie) e che potrebbero interferire con l'azione dei flebotomi. Il tempo intercorrente tra i controlli non dovrebbe essere troppo ravvicinato, in quanto aumenterebbe di troppo la rilevazione di infezioni transitorie; per contro non dovrebbe essere troppo dilatato, in quanto porterebbe alla perdita di informazioni preziose legate alla progressione dell'infezione e dei rispettivi marcatori.

Infine, per valutare in maniera omogenea e ripetibile l'efficacia di un vaccino, dovrebbero essere utilizzati esclusivamente criteri clinici e parassitologici standardizzati e accettati internazionalmente. (Solano Gallego et al., 2009; Oliva et al., 2010; Paltrinieri et al., 2010)

## 2.7 MOLECOLE VACCINALI SPERIMENTATE CONTRO LA LEISHMANIOSI CANINA

Tenendo conto dell'andamento cronologico delle sperimentazioni e delle caratteristiche degli antigeni sperimentati per la profilassi immunitaria della leishmaniosi canina è possibile identificare tre categorie vaccinali (Palatnik-de-Sousa 2008) (Tabella 2.1). In questo paragrafo verranno descritte le caratteristiche delle diverse categorie e, quando presenti, le molecole sperimentate nel cane.

Tabella 2.1		
Vaccini di I° generazione	Vaccini di II° generazione	Vaccini di III° generazione
Parassiti uccisi	Vaccini vivi modificati	Vaccini a DNA
Lisati di parassiti autoclavati	Vaccini che usano batteri e virus come carrier di antigeni	Vaccini basati sulla saliva di antigeni di flebotomi
Mix di parassiti vivi ed uccisi	Antigeni purificati di Leishmania	Vaccini sintetici
	Agenti ricombinanti	

**Vaccini di I generazione.** I vaccini di prima generazione sono i più vecchi e attualmente sono utilizzati in zone del mondo particolarmente depresse dal punto di vista economico in quanto sono facili da preparare e poco costosi. Inoltre, tra i vaccini di I generazione gli autoclavati si sono dimostrati abbastanza stabili anche a temperature ambientali elevate, questa è una caratteristica che diventa di fondamentale importanza proprio nei Paesi più poveri dove spesso non è possibile rispettare la catena del freddo. L'efficacia profilattica di questi vaccini consiste esclusivamente, e non in tutti gli individui, in una attenuazione nello sviluppo di forme cutanee particolarmente aggressive. In questa categoria, pertanto, sono compresi vaccini testati per la protezione delle forme cutanee umane antroponotiche e zoonotiche, sia nel vecchio (*L. tropica*, *L. major*) che nel nuovo mondo (complesso *L. mexicana*) (Oliva et al., 2010).

Vaccini di prima generazione sono stati usati anche per proteggere il cane dalla leishmaniosi viscerale. Un vaccino di questo tipo, allestito da *Leishmania major* mixata con un adiuvante (BCG), ha fornito risultati discordanti, dimostrandosi efficace in uno studio condotto in Iran (Mohebbali et al., 2004), privo di efficacia in un precedente studio condotto in Brasile (Genaro et al., 1996).

Allo stato attuale, in Brasile è commercializzato un vaccino di prima generazione da utilizzare esclusivamente in associazione alla terapia con antimoniale nel trattamento di forme cutanee e muco cutanee. Questa associazione ha mostrato una efficacia che varia dal 35,5 al 69,3 %. (Mohebali et al 2004; Genaro et al 1996)

**Vaccini di II generazione.** Rientrano in questa in questa categoria i vaccini vivi modificati, i vaccini che usano batteri o virus geneticamente modificati come veicoli, i vaccini basati su antigeni purificati di *Leishmania* e gli agenti ricombinanti.

Vaccini vivi modificati o deleti: Come anticipato più sopra, la possibilità di sfruttare le moderne biotecnologie molecolari per creare delle *Leishmania knock-out* ha aperto la strada a promettenti strategie vaccinali. Alcuni di questi vaccini sono stati realizzati mediante delezione di alcuni geni di *Leishmania* responsabili della sintesi degli enzimi diidrofolato reduttasi-timidilato sintasi (Cruz et al., 1991), cisteina-proteinasi (Souza et al., 1994; Alexander et al., 1998), o della pteridina reduttasi (Papadopoulou et al., 2002). I parassiti così deleti vanno incontro ad un ciclo vitale breve, ma sufficiente a generare una risposta immune specifica causando un'infezione abortiva senza determinare malattia. Un altro approccio consiste nell'introdurre nel genoma di *Leishmania* dei geni che ne determinano il 'suicidio', oppure geni che determinano la sensibilità a determinati farmaci, così come fatto in *L. major* introducendo il gene timidina chinasi dell'Herpes virus I sensibile al ganciclovir (Muyombwe et al., 1998) o il gene citosina deaminasi di *Saccharomyces cerevisiae* sensibile alla 5-fluorocitosina (Davoudi et al., 2005).

Vaccini che usano batteri o virus geneticamente modificati come veicoli (vaccini ricombinanti vivi): questi vaccini sono capaci di esprimere antigeni parassitari ad elevato potere immunogeno nell'organismo ospite e stimolare il sistema immune da parte degli stessi microrganismi usati come carrier. Al momento questi vaccini hanno avuto un'applicazione pratica limitata. Esempi di vettori batterici sono *Salmonella typhimurium* e BCG ai quali viene fatto esprimere il gene GP63 (proteasi di superficie) di *L. major* (Yang et al., 1990; Xu et al., 1995; Connell et al., 1993); ad un mutante di BCG viene fatto esprimere il gene LCR1 (proteina flagellare) di *L. chagasi* (Streit et al., 2000) a tachizoiti attenuati di *Toxoplasma gondii* viene fatto esprimere il gene KMP-11 (antigene del kinetoplasto) (Ramirez et al., 2001).

Il vettore virale 'vaccinia virus' è stato utilizzato per fargli esprimere le proteine di superficie G46/M-2/PSA-2 della forma promastigote di *L. amazonensis* (McMahon et al., 1993), o l'antigene LACK che sembra essere promettente nel proteggere i topi contro *L. major* (Gonzalo et al., 2002) e i cani contro l'infezione da *L. infantum* (Ramiro et al., 2003).

Vaccini basati su antigeni purificati: due molecole vaccinali e i relativi vaccini rientranti in questa categoria sono stati sperimentati nella fase III mostrando dei risultati molto promettenti.

Una delle due molecole è rappresentata dal *fucose mannose ligant* (FML), utilizzato insieme all'adiuvante saponina (116-118). Il FML è un complesso glicoproteico, presente sui promastigoti e sugli amastigoti di *Leishmania donovani*, che partecipa nell'interazione tra il parassita e i macrofagi dell'ospite in maniera specie-specifica (Palatnik-de-Sousa et al., 1995). Questa molecola ha dimostrato la sua attività antigenica nell'uomo (Palatnik et al., 1995) e nel cane (Borja Cabrera et al., 1999). Inoltre, è risultata immunogena, immunoprofilattica e immunoterapeutica, in prove di campo, nel topo, nell'hamster e nel cane (Borja Cabrera, 2000; da Silva et al., 2001; Borja Cabrera et al., 2001; Santos et al., 2002; Palatnik de Sousa et al., 1994; Santos et al., 2003). Il vaccino caratterizzato da questa molecola è il Leishmune<sup>®</sup>, prodotto dalla Fort Dodge Animal Health<sup>TM</sup> e autorizzato dal Ministero dell'Agricoltura Brasiliano, è anche il primo vaccino contro la leishmaniosi viscerale canina (Nogueira et al., 2005). Leishmune<sup>®</sup> nel trial di fase III ha mostrato di avere un effetto protettivo significativo nel cane con una efficacia fino all'80%, efficacia che secondo gli autori è diretta ad evitare severe forme cliniche (Rachamim et al., 2003; Borja Cabrera et al., 2002). Quando usato ad una concentrazione doppia di adiuvante il vaccino si è dimostrato anche immunoterapeutico sia per i cani infettati naturalmente (Borja Cabrera et al., 2004) che per i cani infettati sperimentalmente (Santos et al., 2007) con *Leishmania chagasi*.

L'altra molecola che si è dimostrata promettente in chiave vaccinale è l'antigene LiESAp (oggetto della seguente sperimentazione) un prodotto di escrezione/secrezione ottenuto dalla purificazione di amastigoti di *L. infantum* addizionato con muramyl dipeptide (MDP) come adiuvante. (Lemestre 2005, 2007)

Antigeni ricombinanti: proteine ricombinanti da sole o in combinazione, associate ad adiuvanti o veicoli batteri, sono state sperimentate nel modello murino e nel cane. Tra gli antigeni ricombinanti che hanno dato risultati promettenti nel cane in fase II, ma che necessitano di ulteriori sperimentazioni in campo, si possono citare quelli sperimentati da Moreno e collaboratori ossia l'istone 1 (H1) e la proteina idrofilica acilata di superficie B1 (HASPB1) singolarmente, oppure insieme con Montanide<sup>TM</sup>, e la poliproteina MML utilizzando come adiuvante MPL<sup>®</sup>-SE. (Moreno J et al., 2007)

A differenza delle molecole sopra citate, in questa categoria di vaccini vi è una proteina chimerica (Leish-111f) formata dall'unione di tre antigeni di *Leishmania* (TSA; LmSTI1; LeIF) che è stata l'unica provata in fase III in Italia su 45 cani beagle, ma che purtroppo non ha mostrato, sul campo, una efficacia protettiva soddisfacente. (Gradoni et al., 2005)

### **Vaccini di III generazione**

Vaccini a DNA: Numerosi antigeni sono stati testati allo scopo, soprattutto negli animali di laboratorio (topo su tutti gli altri). Nel cane sono stati testati i geni codificanti per i seguenti antigeni: HPB-LACK da *L. infantum* (adiuvante: pCIneo, vettore: Vaccinia Virus) (Ramiro et al., 2003); HPB CPa e CPba da *L. infantum* (adiuvanti: pCB6+ Montanide 720 and CPG) (Rafati et al., 2005); KMPII, TRYP, LACK and GP63 da *L. infantum* (adiuvante: pMOK) (Rodríguez-Cortés et al., 2007); NH36 da *L. chagasi* (adiuvante: VR1012) (Borja Cabrera et al., 2007). Tutti questi vaccini non hanno ancora superato la Fase II e, sebbene a diverso titolo, sembrano essere piuttosto promettenti (Clarisa e Palatnik, 2008).

Vaccini basati su antigeni della saliva dei flebotomi: è noto che la saliva dei flebotomi contiene molecole biologicamente attive con attività anti-aggregante piastrinica, vasodilatatrice e di promozione della diffusione del parassita nei tessuti (ialuronidasi) (Ribeiro, 1995). Tenendo conto di ciò sono stati sperimentati nel topo due vaccini (MAXADILAN e anti- SP15 ottenuti da *Phlebotomus papatasi*) che nonostante abbiano mostrato una discreta efficacia, necessitano naturalmente di altri studi. (Valenzuela et al., 2001)

Vaccini sintetici: sostanzialmente si tratta più di una strategia da sviluppare che non di una realtà già perseguita. Negli ultimi anni si è appurato che i linfociti T CD4+ e CD8+ giocano un ruolo importante sia nella difesa dalla leishmaniosi che nella sua cura (Clarisa e Palatnik, 2008), identificare molecole capaci di stimolare efficacemente questi citotipi cellulari, potrà costituire la base per lo sviluppo di vaccini sintetici adeguati.

## CAPITOLO 3

### 3.1 SCOPO DELLO STUDIO

Nell'ultimo decennio l'incidenza della leishmaniosi, sia nel cane che nell'uomo, è apparsa in netto aumento.

L'attenzione degli studiosi che si interessano dell'argomento è oggi rivolta soprattutto all'immunoterapia e alla profilassi vaccinale, senza naturalmente trascurare l'interessantissimo filone di ricerca volto alla messa a punto di sostanze utilizzabili nei confronti dei flebotomi. Diversi esperimenti vaccinali sono in corso in varie parti del mondo anche se, almeno per quanto riguarda la specie canina, nonostante risultati sperimentali incoraggianti, non sono stati ancora messi a punto dei protocolli utilizzabili nella pratica professionale. Le molecole di seconda generazione hanno dato risultati soddisfacenti ponendo buone basi per le sperimentazioni future. Tra queste molecole il "LiESAp", addizionato con muramyl dipeptide (MDP) come adiuvante, ha prodotto risultati soddisfacenti, tuttavia la bassa incidenza di malattia durante il periodo di sperimentazione pone in dubbio la reale efficacia del vaccino. Proprio da quest'ultima considerazione prende corpo l'idea di sperimentare un vaccino "analogo" al "LiESAp" in una zona del sud Italia ad endemia notoriamente elevata: Santa Anastasia [prevalenza di leishmaniosi canina pari al 40,4% (Maroli et al., 2001)].

Lo studio ha lo scopo di verificare l'efficacia protettiva di tale vaccino addizionato con adiuvante (non divulgabile) nei confronti dell'infezione e dello sviluppo della malattia indotte da *Leishmania infantum* in cani naturalmente esposti in zona endemica.

In questo lavoro verrà valutata in modo particolare l'efficacia del vaccino nei confronti dell'attecchimento dell'infezione, mentre l'efficacia del vaccino nei confronti dello sviluppo della malattia, sarà oggetto della tesi di dottorato svolta dalla dottoressa Roberta De Santo. Data la natura strettamente correlata delle due sperimentazioni, sarà inevitabile la presenza di alcuni punti di sovrapposizione, soprattutto nella descrizione delle metodiche, tra i due lavori di tesi.

Prima di descrivere le metodologie d'indagine seguite nello studio si ritiene utile fornire una breve descrizione del prodotto immunizzante già testato e descritto in letteratura.

#### CANE INFETTO

Questa categoria comprende cani in cui è stata confermata la presenza del parassita attraverso indagini dirette (esame citologico e/o istologico, PCR e xenodiagnosi) e indirette (test sierologici e la valutazione risposta immunitaria). Tali cani possono essere sani o avere segni clinici o patologici associati con altre malattie. In una zona endemica la positività alla PCR su cute o sangue ottenuta durante il periodo di trasmissione, in assenza di segni clinici, può non essere sufficiente per considerare un cane infetto (Paltrinieri et al., 2010).

## 3.2 CARATTERISTICHE DEL VACCINO

La molecola LiESAp è un prodotto di escrezione/secrezione ottenuto dalla purificazione di amastigoti di *L. infantum* addizionato con muramyl dipeptide (MDP) come adiuvante. I promastigoti di un ceppo di *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) sono stati coltivati in un terreno di coltura (CDM/LP) (Marlen et al., 1999; Lemesre 1994). Quando la concentrazione parassitaria raggiungeva il valore di  $2-3 \times 10^7$  promastigoti per millilitro nel periodo di sei giorni, la coltura veniva centrifugata (2000 g, 20 min, 4°C) per rimuovere i parassiti. Il sopranatante veniva raccolto, filtrato (filtri con pori delle dimensioni di 0,2 micron, Millipore, Billerica, MA, USA) per eliminare i promastigoti asportati, concentrati approssimativamente cento volte e dializzati mediante ultrafiltrazione con un filtro 3-kDa-cutoff (Pal). La concentrazione proteica veniva determinata con il metodo di Bradford (Bio-Rad, Laboratories). Il placebo era ottenuto da colture prive di parassiti e processate come descritto per il sopranatante delle colture parassitate (Lemestre 2005). Il vaccino LiESAp ha dato risultati soddisfacenti sia in uno studio condotto presso la National Veterinary School of Lyon (Francia), studio condotto su 18 cani di razza beagle infettati sperimentalmente mediante inoculazione intravenosa di promastigoti di *L. infantum* (Lemesre 2005), che in un successivo studio molto più ampio condotto su circa 400 cani residenti in area endemica alla leishmaniosi canina nel Sud della Francia (Lemesre 2007). In quest'ultimo studio il vaccino ha mostrato di possedere una efficacia del 92%, però tali risultati risentono in maniera fortemente negativa della scarsissima incidenza registrata nei due anni di follow-up che non consente di trarre conclusioni definitive sulla reale efficacia del vaccino. Per questo motivo il vaccino è stato sperimentato in Italia in area considerata ad alto tasso di endemia per la leishmaniosi canina.

### 3.3 MATERIALI E METODI

Il presente studio è stato condotto reclutando 43 cani di razza beagle dell'età di 6 mesi, 50% maschi e 50% femmine, identificati mediante microchip applicato sottocute e tatuaggio applicato all'orecchio destro, nati in inverno in una zona indenne da leishmaniosi canina. I cani sono stati divisi in due gruppi: il gruppo dei vaccinati formato da 23 soggetti e il gruppo controllo formato da 20 animali. Ai cani del gruppo dei vaccinati, prima del loro trasferimento nella zona endemica, è stato somministrato il vaccino per via sottocutanea, per tre volte a distanza di tre settimane e un richiamo dopo un anno dalla terza somministrazione, mentre ai cani del gruppo controllo è stato somministrato un placebo, non contenente adiuvante. Successivamente, entrambi i gruppi sono stati trasferiti presso un canile privato del Comune di Sant'Anastasia in provincia di Napoli. Tutti i cani venivano alimentati e puliti una volta al giorno, secondo le norme in vigore per quell'allevamento, e controllati al fine di evidenziare anomalie. Inoltre, una volta l'anno venivano vaccinati contro leptospirosi, cimurro, epatite, parvovirus, adenovirus-2 e sottoposti a trattamento antielmintico ogni sei mesi.

Come previsto dal protocollo, i cani durante il periodo della sperimentazione non potevano essere trattati con farmaci repellenti per i flebotomi o ricevere farmaci contro la leishmaniosi (ad esempio: amfotericina B, metronidazolo, chetoconazolo, miltefosine, aminosidina, ecc.). I trattamenti contro gli ectoparassiti venivano fatti solamente nelle aree in cui soggiornavano i cani.

Entrambi i gruppi, nell'arco di tre anni, sono stati sottoposti a diversi monitoraggi secondo lo schema illustrato nella tabella 3.1.

**Tab 3.1 monitoraggio ed analisi effettuate durante i tre anni dello studio**

<b>Data studio</b>	<b>Monitoraggio</b>	<b>Analisi di laboratorio</b>
<b>M0</b>	Visita clinica - prelievo di sangue - aspirato midollare e linfonodale	Coltura linfonodale - estrazione Dna dal midollo - n-PCR midollare – r.t-PCR midollare-IFAT
<b>M3</b>	Visita clinica - prelievo di sangue	IFAT
<b>M6</b>	Visita clinica - prelievo di sangue	IFAT
<b>M9</b>	Visita clinica - prelievo di sangue - aspirato midollare e linfonodale	Coltura linfonodale - estrazione Dna dal midollo - n-PCR midollare – r.t-PCR midollare-IFAT
<b>M12</b>	Visita clinica - prelievo di sangue	IFAT
<b>M15</b>	Visita clinica - prelievo di sangue	IFAT
<b>M18</b>	Visita clinica - prelievo di sangue - aspirato midollare e linfonodale	Coltura linfonodale - estrazione Dna dal midollo - n-PCR midollare – r.t-PCR midollare-IFAT
<b>M21</b>	Visita clinica - prelievo di sangue	IFAT
<b>M24</b>	Visita clinica - prelievo di sangue - aspirato midollare e linfonodale	Coltura linfonodale - estrazione Dna dal midollo - n-PCR midollare – r.t-PCR midollare-IFAT
<b>M27</b>	Visita clinica - prelievo di sangue	IFAT
<b>M30</b>	Visita clinica - prelievo di sangue - aspirato midollare e linfonodale	Coltura linfonodale - estrazione Dna dal midollo - n-PCR midollare – r.t-PCR midollare-IFAT
<b>M33</b>	Visita clinica - prelievo di sangue	IFAT
<b>M:</b> mese; <b>IFAT:</b> immunofluorescenza indiretta; <b>n-PCR:</b> nested PCR; <b>rt-PCR:</b> real time PCR		

Durante di ogni controllo, per ogni cane veniva compilata una cartella clinica che prevedeva uno score per ogni segno clinico considerato (Fig. 3.1).

Per quanto riguarda la campionatura del materiale biologico prelevato, ogni campione veniva identificato con un codice specifico per lo studio in corso. Data, tatuaggio e natura del campione ( S=siero, BM= aspirato midollare, B= sangue in EDTA, D= DNA).

### GENERAL EXAMINATION SHEET

STUDY CODE F-136.010000-58054

Page 1/1

<b>TIME :</b> _____ <b>DATE :</b> _____ <b>TATTOO :</b> _____ <b>TEMPERATURE (°C) :</b> _____ <b>WEIGHT (KG) :</b> _____ <b>Comments :</b> ..... ...	<b>SAMPLING SPECIFICATION</b> Uncoated tubes <input type="checkbox"/> EDTA tube <input type="checkbox"/> Bone marrow puncture <input type="checkbox"/> Lymph node aspirates <input type="checkbox"/>
---	--

ORGAN OR DISORDERS	TROUBLES	GRADING		
<b>BCS</b>	<b>Weight loss (kg)</b>	None <input type="checkbox"/>	Mild <input type="checkbox"/>	Severe <input type="checkbox"/>
<b>Skin</b>	<b>Ulcers/ Nodules</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>
	<b>Alopecia</b>	None <input type="checkbox"/>	Mild <input type="checkbox"/>	Severe <input type="checkbox"/>
	<b>Furur</b>	None <input type="checkbox"/>	Mild <input type="checkbox"/>	Severe <input type="checkbox"/>
	<b>Onychogryphosis</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>
<b>Sensorial disorders</b>	/	Normal <input type="checkbox"/>	Depression <input type="checkbox"/>	Convulsion <input type="checkbox"/>
<b>Mucosae</b>	/	Normal <input type="checkbox"/>	Pallor <input type="checkbox"/>	Jaundice <input type="checkbox"/>
<b>Lymph Nodes and spleen</b>	<b>Mandibular</b>	Normal <input type="checkbox"/>		Enlarged <input type="checkbox"/>
	<b>Pre-scapular</b>	Normal <input type="checkbox"/>		Enlarged <input type="checkbox"/>
	<b>Popliteal</b>	Normal <input type="checkbox"/>		Enlarged <input type="checkbox"/>
	<b>Spleen</b>	Normal <input type="checkbox"/>		Enlarged <input type="checkbox"/>
<b>General conditions</b>	<b>Pu/Pd</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>
	<b>Anorexia</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>
	<b>Diarrhoea</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>
	<b>Vomiting</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>
<b>Eyes</b>	<b>Blepharitis</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>
	<b>Conjunctivitis</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>
	<b>Keratitis</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>
	<b>Uveitis</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>
<b>Articulations</b>	<b>Arthritis</b>	None <input type="checkbox"/>		Yes <input type="checkbox"/>

I certify that all the information are complete and exact  
 Dr (Paraph and date) : \_\_\_\_\_

**Fig.3.1**

## **3.4 DESCRIZIONE DELLE METODICHE**

### ***3.4.1 Siero***

Il siero necessario per le indagini sierodiagnostiche veniva ottenuto da sangue periferico prelevato con siringa da 10 ml da una vena brachiale o, nel caso di cani di piccola taglia, da una vena giugulare. Il campione, posto in una provetta da 10 ml, veniva lasciato coagulare e successivamente centrifugato a 1.500 rpm per 10 min. Il siero così ottenuto veniva raccolto e congelato a -40°C fino al momento del test.

### ***3.4.2 Aspirato midollare***

L'aspirato di sangue e frustuli midollari veniva ottenuto mediante sterno-mielocentesi, effettuata con siringa da 10 ml, munita di ago rosa da 18G, dalla seconda o terza sternebra tenendo l'animale in posizione latero-laterale con l'arto superiore flesso. Il materiale midollare veniva ottenuto per aspirazione lenta fino ad un volume di circa 0,5 ml e conservato a -40°C in una provetta con anticoagulante (EDTA) per la successiva estrazione di DNA per la n-PCR.

### ***3.4.3 Aspirato linfonodale***

Individuati, mediante palpazione, i linfonodi poplitei e prescapolari venivano esposti in posizione superficiale sottocutanea mediante pressione digitale provvedendo alla tosatura del pelo e detersione della zona cutanea esposta. L'ago di una siringa da 2,5 ml contenente 0,5 ml di soluzione fisiologica sterile, veniva delicatamente infisso all'interno del linfonodo e la soluzione spinta con forza nel ganglio. Dopo aver fatto scorrere più volte l'ago al suo interno, in modo da provocare la rottura del tessuto linfatico, il materiale veniva aspirato ottenendo una sospensione ricca di frustuli utilizzata per la semina in appositi terreni di coltura (paragrafo che segue), in condizioni di massima asepsi.

### ***3.4.4 Terreno di coltura: Evans' modified Tobie's medium (EMTM)***

***(Evans, 1987)***

**E'** un ricco terreno bifasico costituito da una componente liquida e da una solida (agar-sangue) (Tabella 3.2). E' noto essere un buon terreno per l'isolamento e il mantenimento di tutte le specie di *Leishmania* descritte nel mondo.

<b>Tabella 3.2 - TERRENO EMTM</b>			
<b>Fase liquida (pH 7,2)</b>	<b>g/L</b>	<b>Fase solida</b>	<b>g/L</b>
<b>KCl</b>	0,4	Bacteriological peptone (Oxoid L37)	5
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O</b>	0,06	Beef extract (Oxoid Lab-Lemco L29)	3
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,06	NaCl	8
<b>CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</b>	0,185	Agar (Oxoid purified)	20
<b>MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O</b>	0,1	Bacteriological peptone (Oxoid L37)	5
<b>Mg Cl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O</b>	0,1	Beef extract (Oxoid Lab-Lemco L29)	3
<b>NaCl</b>	8	NaCl	8
<b>L-Prolina</b>	1	Agar (Oxoid purified)	20

Le due fasi, sterilizzate in autoclave a 121°C per 20 min, possono essere conservate a 4°C per più di un anno.

La fase solida viene completata con l'aggiunta del 15% di sangue ventricolare di coniglio, defibrinato meccanicamente mediante palline di vetro di 3-4 mm di diametro. In breve, l'agar arricchito di nutrienti viene sciolto e raffreddato ad una temperatura di circa 45°C; ad esso vengono aggiunti 15 ml di sangue di coniglio e il composto viene distribuito in tubi da batteriologia e in ampolline di plastica sterili da criogenia (NUNC) da 5 ml e lasciato raffreddare su piano inclinato in modo da assumere la forma di becco di clarino. I tubi e le ampolline contenenti EMTM agar-sangue possono essere mantenuti a 4°C per 15-20 giorni.

Le due fasi, agar-sangue e fase liquida, vengono mantenute separate a 4°C fino al momento dell'uso per evitare il degradamento del terreno e il distacco in soluzione dei globuli rossi. Al momento dell'uso la fase liquida viene completata con l'aggiunta di 5-10% di siero fetale bovino (Fetal Calf Serum, FCS) (HyClone), 250 µg/ml di Gentamicina (SIGMA) e 500 µg/ml di 5-Fluorocitosina (SIGMA). Appena pronta, questa soluzione finale viene distribuita in quantità di 1-1,5 ml per i tubi e 0,5 ml per le ampolline.

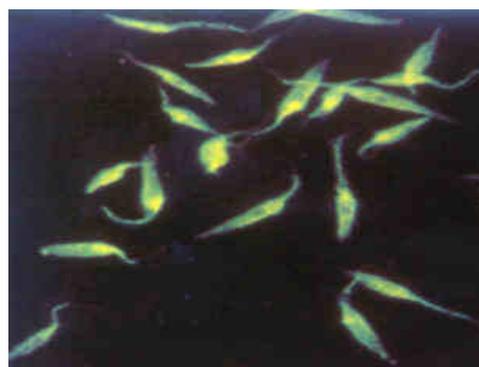
### **3.4.5 Test di immunofluorescenza indiretta (IFAT)**

L'antigene era costituito da promastigoti di *L. infantum*, ceppo di riferimento OMS MHOM/TN/80/IPT1 (codice rapido di laboratorio: IPT1), coltivati in EMTM a 22°C. I parassiti, prelevati da tubi di terreno seminati da 3-4 giorni, venivano lavati 3 volte in PBS pH=7,2 a 2.400 rpm per 20 min. La sospensione, aggiustata ad una apposita concentrazione, veniva apposta sotto forma di goccia da 25 µl su vetrini multi-spot (Sanofi Diagnostics Pasteur). Le gocce, seccate a temperatura ambiente, venivano fissate con acetone freddo per 10 min.

Per quanto riguarda l'esecuzione, le diluizioni a raddoppio del siero in esame venivano effettuate in PBS a partire da 1:40 (considerato da alcuni autori il titolo minimo per la leishmaniosi del cane). Queste venivano apposte sull'antigene ed incubate in termostato a 37°C per 30 min. In ogni test venivano utilizzati un siero di controllo positivo ed uno negativo per *Leishmania*. Dopo aver eseguito un lavaggio per 10' in PBS, sul vetrino veniva posto l'antisiero costituito da globuline di coniglio anti-IgG di cane coniugate con isotiocianato di fluoresceina (SIGMA), opportunamente titolate in precedenza. La diluizione generalmente usata, effettuata con PBS, era di 1:100 con aggiunta di Bleu di Evans (1:4000) come colorante di contrasto. Il vetrino veniva posto di nuovo in termostato a 37°C per 30 min. Dopo lavaggio in PBS per altri 10', sul vetrino venivano apposti una goccia di glicerolo-PBS ed un coprioggetto.

La lettura veniva effettuata su microscopio a fluorescenza Leitz con ingrandimento 300x (Fig. 3.2).

Per tutti gli studi, la diluizione cut-off da noi presa in considerazione come indicativa di infezione era quella di 1:160.



**Figura 3.2**

### ***3.4.6 Estrazione del DNA***

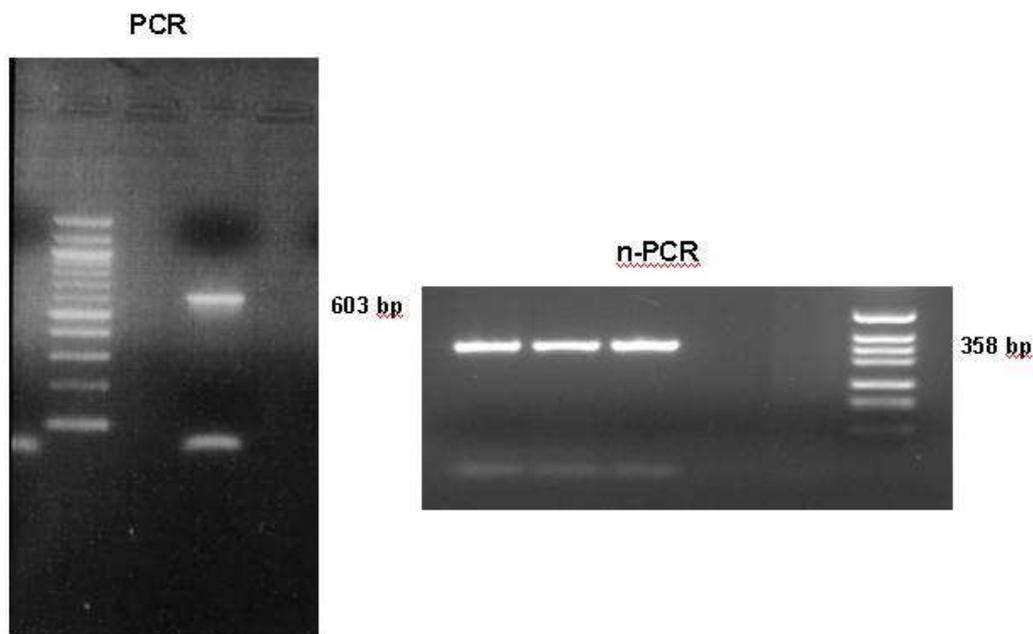
Il DNA veniva estratto da un singolo campione di midollo osseo o buffy-coat mediante il kit Easy-DNA™ (Invitrogen, San Diego, CA, USA). A 350 µl di campione venivano aggiunti 500 µl di soluzione A, tampone di lisi provvisto dal kit, omogenati per qualche secondo e incubati a 65°C per 6 minuti. Alla sospensione venivano aggiunti 900 µl di cloroformio ed essa veniva accuratamente agitata, la precipitazione del DNA veniva ottenuta aggiungendo 200 µl di soluzione B, tampone di precipitazione, seguita da una centrifugazione a 13.000 rpm per 10 minuti.

La centrifugazione permetteva così la formazione di due fasi: a) il DNA in superficie, nella fase acquosa, mentre b) le proteine e i lipidi nell'interfaccia solida e il cloroformio nella parte inferiore.

Il DNA veniva rimosso, precipitato con etanolo e risospeso in TE-buffer. Il DNA purificato era così usato direttamente per la PCR (Mathis et al., 1995), o mantenuto a 4°C per 1 o 2 giorni o a -20°C per tempo indeterminato.

### 3.4.7 PCR

La reazione di PCR utilizzata permette di identificare una sequenza ripetuta del SSU rRNA (Van Eys et al., 1992) (Figura 3.3).



**Figura 3.3. Prodotti di PCR e n-PCR della sequenza ripetuta del SSU rRNA di *Leishmania* (Van Eys et al., 1992) ottenuti a partire da campione di midollo osseo di cane infetto.**

Per la prima reazione di amplificazione è stata utilizzata la coppia di primers R221 (5'GGTTCCTTTCCTGATTACG3') e R332 (5'GGCCGGTA AAGGCCGAATAG5') il cui prodotto di amplificazione è di 603 bp.

La reazione veniva condotta in un volume finale di 50 µl contenente: a) 10 µl di DNA, b) 25 µl di Master Mix (Promega), c) 50 pmol di ciascun primer R221 e R332 e d) il resto del volume con acqua bidistillata.

Le condizioni di amplificazione dopo una denaturazione iniziale a 94°C per 5 min., erano le seguenti: a) denaturazione a 94°C per 75 sec., b) annealing a 60°C per 1 min., c) polimerizzazione a 72°C per 2 min.; per 32 cicli in termociclo automatico (Perkin Elmer).

Dieci µl dei prodotti di PCR venivano analizzati su gel di agarosio 1,5% con 0,5 µg/ml di etidio bromuro utilizzando un controllo negativo (senza "template") e un controllo positivo (con DNA "template" di *Leishmania*).

### **3.4.8 nested (n)-PCR**

Nella seconda reazione di PCR (n-PCR) sono stati usati i primers R223 (5'TCCCATCGCAACCTCGGTT3') e R333 (5'AAAGCGGGCGCGGTG CTG3') il cui prodotto di amplificazione è di 358 bp e risulta interno alla sequenza descritta nella Sezione 4.5.2 (Van Eys et al., 1992) (Figura 15).

Per la n-PCR, la reazione veniva condotta in un volume finale di 50 µl contenente: a) 3 µl del prodotto della prima PCR, b) 25 µl di Master Mix (Promega), c) 50 pmol di ciascun primer R223 e R333 e d) il resto del volume con acqua bidistillata.

Le condizioni di temperatura di amplificazione usate erano uguali a quelle sopra descritte.

Per ogni esperimento veniva fatto un controllo negativo (senza "template") e un controllo positivo (con DNA "template" di *Leishmania*).

Dieci µl dei prodotti di n-PCR venivano analizzati su gel d'agarosio 1,5% con 0,5 µg/ml di etidio bromuro come sopra descritto.

### **3.4.9 Real Time PCR**

La Real Time PCR è stata effettuata con il sistema Applied Biosystem 7900. Brevemente, la real time PCR è stata effettuata impiegando 5 µl di sangue /midollo, primers specifici del kinetoplasto e sonde marcate con FAM come descritto precedentemente (Mary et al., 2004). La quantificazione è stata fatta per comparazione con differenti quantità standard del DNA di *Leishmania infantum* (diluizioni del parassita variabili tra 10.000 e 0.01)

### 3.5 RISULTATI

Prima di soffermarsi sulla descrizione dei risultati, si ritiene opportuno effettuare una descrizione dello stato di infezione secondo il quale i cani sono stati raggruppati.

In relazione ai risultati ottenuti dalle analisi sierologiche e parassitologiche sui cani in studio, lo stadio di infezione da *Leishmania* veniva ascritto a ciascuna delle due categorie (Oliva et al 2006):

- Infezione subpatente:** positività variabile nel tempo della n-PCR del campione midollare, e/o bassa positività del titolo IFAT al di sotto del valore soglia (1:80); striscio midollare, ELISA-K39 e coltura linfonodale negativi;
- Infezione patente:** costante positività della n-PCR del campione midollare; titolo IFAT elevato ( $\geq 1:160$ ) costante o in aumento; coltura linfonodale costantemente positiva; ELISA-K39 positiva e/o striscio midollare positivo.

Quest'ultimo stato di infezione, veniva quindi definito come asintomatico o sintomatico sulla base del riscontro clinico che sarà approfondito nella tesi della dott.ssa Roberta De Santo.

Le varie categorie d'infezione sono riassunte nella Figura 3.4.

## Definition of the status / Progression of the infection

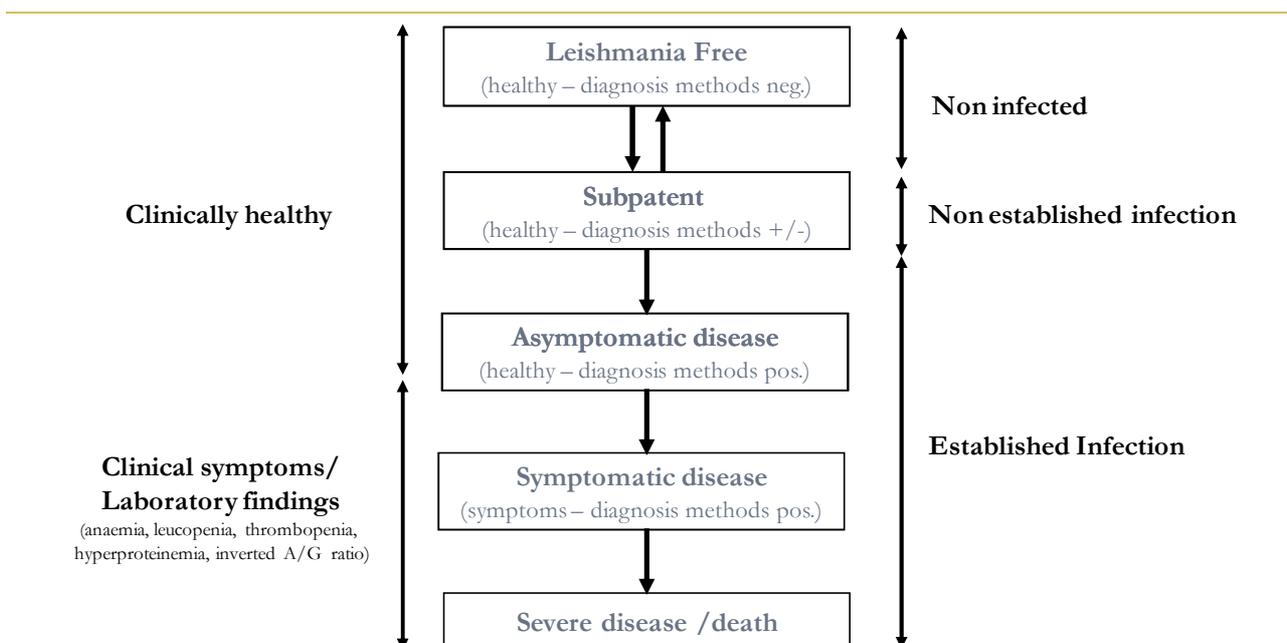


Figura 3.4

I risultati dei gruppi controllo e vaccinati, sono forniti nelle tabelle 4.3 e 4.4.

**Tabella 4.3 - GRUPPO CONTROLLO**

Soggetto	Tempo	n-PCR	RT-PCR (P/ml - log10)	EMTM	IFAT (1/X)	IFAT DVTP (1/X)	Hemato / bioch	Clinical signs	Conclusioni
1	M9	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	M15	neg		neg	< 1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	M18	neg		neg	1/40		Normale	Moderata perdita peso	<b>Negativo</b>
	M21	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	M24/M 25	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	M30	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	M33	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
2	M9	pos	6.5	pos	1/640	500	WBC↓ RBC↓ PLT↓	Mucose pallide	<b>Patente sintomatico</b>
	M15	pos	5.3	pos	20480	5000	WBC↓ RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito TP ↑	Linfoadenopati a (pre- scapolari, poplitei e mandibolari)	<b>Patente sintomatico</b>
	M18	pos	6.6	pos	40960	5000	RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito TP ↑	Atrofia muscolare perdita di peso Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	<b>Patente Sintomatico</b>
	M20	Alla necropsopia post-eutanasia si è rilevato: moderata epatomegalia, splenomegalia,							<b>Soppresso</b>

		linfadenpatia generalizzata e alterazione renale – Presenza di parassiti nella milza e fegato							
3	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Lieve dimagrimento	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	pos	4.9	pos	320	2000	PLT↓	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M18</b>	pos	6.5	pos	5120	5000	RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito	Linfonodi poplitei aumentati	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M21</b>	pos	6.7	pos	20480	5000	RBC↓ rapporto A/G invertito	Mucosa pallide Perdita di peso atrofia muscolare	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M23</b>	Alla necropsia dopo la morte naturale si è rilevato: moderata epatomegalia, con aree di necrosi, linfadenpatia generalizzata e nefriti							
4	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/40		Normal	Linf. Prescapolari aumentati	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Splenomegalia	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (faint)		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Negativo</b>
5	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Lieve perdita di peso	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (faint)		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Subpatente</b>

	<b>M30</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	pos		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
<b>6</b>	<b>M9</b>	pos	3.3	pos	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M15</b>	pos	5.6	pos	5120	2000	RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito	Seborrea secca Atrofia muscolare Perdita di peso Linfonodi pescapolari aumentati	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M18</b>	pos	6.5	pos	20480	1250 0	RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito	Perdita di peso atrofia muscolare Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M20</b>	Alla necropsopia post-eutanasia si è rilevato: moderata epatomegalia, splenomegalia, linfadenpatia generalizzata e alterazione renale – Presenza di parassiti nella milza e fegato							<b>Deceduto</b>
<b>7</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓	asintomatico	<b>negativo</b>
	<b>M15</b>	pos	3.8	pos	160	(-)	RBC↓	asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M18</b>	pos	6.2	pos	1280	2000	PLT↓	asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M21</b>	pos	6.6	pos	20480	5000	PLT↓ rapporto A/G invertito	Perdita di peso linfadenopati a (pre- scapolari) Splenomegalia	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M24/M25</b>	pos	6.3/6 .4	pos	10240	5000	RBC↓ PLT↓ WBC↓ Rapporto	perdita di peso linfadenopati a (poplitei)	<b>Patente sintomatico</b>

								A/G invertito TP ↑	
--	--	--	--	--	--	--	--	--------------------------	--

**CONTROLLO (Continuo)**

Soggetto	Tempo	n-PCR	RT-PCR (P/ml - log10)	EMTM	IFAT (1/X)	IFAT DVTP (1/X)	Emato / bioch	Segni clinici	Conclusioni
<b>8</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓ TP↓	Severa perdita di peso Alopecia lieve Mucose pallide	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	<b>pos</b>	1.7	(neg)	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M18</b>	<b>pos</b>	6.0	<b>pos</b>	320	(-)	PLT↓	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M21</b>	<b>pos</b>	6.6	<b>pos</b>	10240	5000	PLT↓ rapporto A/G invertito	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M24/M25</b>	<b>pos</b>	6/5.5	<b>pos</b>	10240	5000	RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito  TP ↑	Paracheratosi nasale Linfonodi popliyei e prescapolai aumentati Perdita di peso media	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M30</b>	pos		pos	1/5120		PLT↓ rapporto A/G invertito  TP ↑	Ulcere/noduli, Linfonodi prescapolari aumentati	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M33</b>	pos		pos	1/2560		RBC↓ PLT↓ rapporto	prescapolari ingrossati, scarse	<b>Patente sintomatico</b>

							A/G invertito  TP ↑	condizioni generali, atrofia muscolare	
9	<b>M9 + M15</b>	neg		neg	<1/40		TP↓	Asintomatico	<b>negativo</b>
	<b>M18</b>	pos	4.7	pos	<1/40	(-)	WBC↑ PLT↓	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M21</b>	pos	6.7	pos	5120	1000	WBC↑ PLT↓ rapporto A/G invertito  TP ↑	Asintomatico	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M24/M25</b>	pos	5.8/6.2	pos	10240	5000	PLT↓ rapporto A/G invertito  TP ↑	Linfoadenopatia (poplitei)	<b>Patente sintomatico</b>
10	<b>M9 + M15</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	pos	2.3	neg	<1/40	(-)	RBC↓	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M21</b>	pos	4.7	pos	1/640	(-)	RBC↓ rapporto A/G invertito	Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M24/M25</b>	pos	6.7/6.6	pos	1/5120	2000	RBC↓WBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito	Splenomegalia	<b>Patente sintomatico</b>

	<b>M 30</b>	pos		pos	1/2560		RBC↓PLT↓ rapporto A/G invertito TP ↑	Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M 33</b>	pos		pos	1/5120		RBC↓PLT↓ rapporto A/G invertito TP ↑	Onicogrifosi, Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati Condizioni generali scarse Atrofia muscolare	<b>Patente sintomatico</b>
<b>11</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Linfonodi prescapolari aumentati	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (faint)		neg	< 1/40		Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓	Condizioni generali scarse	<b>Negativo</b>
<b>12</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Negativo</b>
<b>13</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓ PLT↓ TP↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	pos		neg	1/80		RBC↓	Asintomatico	<b>Subpatente</b>

14	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Lieve perdita di peso e poplitei ingrossati	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓	Linfonodi poplitei aumentati	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Condizioni generali scarse	<b>Negativo</b>
15	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Prescapolari ingrossati	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/40		TP↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (faint)		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Condizioni generali scarse	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	<1/40		TP↓	Condizioni generali scarse	<b>Negativo</b>
16	<b>M9</b>	pos	3.4	neg	<1/40	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	<1/40	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/40	(-)	Normale	Linfonodi poplitei aumentati	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	<1/40	(-)	Normale	Lieve dimagrimento Congiuntivite	<b>Negativo</b>

	<b>M24/M25</b>	neg	1.6/0	neg	1/40	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Congiuntivite	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓	Condizioni generali scarse	<b>Negativo</b>

### CONTROLLO (continuo)

Soggetto	Tempo	n-PCR	RT-PCR (P/ml - log10)	EMT M	IFAT (1/X)	IFAT DVTP (1/X)	Hemato / bioch	Segni clinici	Conclusioni
	<b>M 9</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Ulcere e noduli	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	Pos (faint)		neg	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M18</b>	Pos (Faint)		neg	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	<b>Subpatent infection</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (Faint)	0/0	neg	<1/40	(-)/ND	Normale	Asintomatico	<b>Subpatent infection</b>
	<b>M 30</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 33</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
<b>18</b>	<b>M 9</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 15</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 18</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Splenomegalia	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (Faint)		neg	<1/40	(-)/ND	RBC↓	Splenomegalia	<b>Subpatente</b>
	<b>M 30</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 33</b>	neg		neg	1/40		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>

<b>19</b>	<b>M 9</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 15</b>	neg		neg	<1/40		PLT ↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 18</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/80	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (Faint)		neg	1/40	(-)/ND	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M 30</b>	pos		pos	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M 33</b>	pos		pos	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
<b>20</b>	<b>M 9</b>	neg		neg	<1/40		PLT ↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 15</b>	neg		neg	<1/40		PLT ↓	Onicogrifosi	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	<1/40		PLT ↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (Faint)		neg	<1/40	(-)/ND	Normale	Onicogrifosi	<b>Subpatente</b>
	<b>M 30</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 33</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>

**Tabella 4.4 - GRUPPO VACCINATI**

<b>Tattoo</b>	<b>Time</b>	<b>n-PCR</b>	<b>RT-PCR (P/ml - log10)</b>	<b>EMTM</b>	<b>IFAT (1/X)</b>	<b>IFAT DVTP (1/X)</b>	<b>Hemato / bioch</b>	<b>Clinical signs</b>	<b>Conclusioni</b>
<b>21</b>	<b>M9</b>	pos	4.3	pos	1/80	500	PLT↓ TP ↑	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M15</b>	pos	6.9	pos	1/320	5000	RBC↓ PLT↓ TP ↑ rapporto A/G invertito	Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M18</b>	pos	7.0	pos	1/1280	12500	RBC↓ PLT↓ TP ↑ rapporto A/G invertito	Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati)	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M21</b>	pos	6.9	pos	1/40960	5000	RBC↓ PLT↓ TP ↑ rapporto A/G invertito	Atrofia muscolare Dimagrimento Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati popliteal) Splénomegalia	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos	6.3/NT	pos	1/20480	12500	RBC↓ PLT↓ TP ↑ rapporto A/G invertito	Atrofia muscolare Dimagrimento Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati popliteal) Splénomegali)	<b>Patente sintomatico  Soppresso</b>
Necropsia post-eutanasia : lesion dermatologiche diffuse, epatomegalia, splenomegalia, linfadenopati a generalizzata, e alterazioni renali e presenza di amastigoti in molte cellule some amastigotes in some cells									
<b>M 9</b>	neg			neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>

<b>22</b>	<b>M 15</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	pos	2.8	pos	1/160	(-)	WBC↑	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M21</b>	pos	3.8	pos	1/640	200	Normale	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M24/M25</b>	pos	6.1/4.1	pos	1/2560	1000	PLT↓	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M 30</b>	pos		pos	1/5120		RBC↓ PLT↓ TP ↑ Inverted A/G ratio	Linfonodi poplitei aumentati	<b>Patente sintomatico</b>
	<b>M 33</b>	pos		pos	1/2560		Inverted A/G ratio	poor body condition, muscle atrophy	<b>Patente sintomatico</b>

**VACCINATI (continuo)**

<b>23</b>	<b>M 9</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	asymptomatic	<b>Negativo</b>
	<b>M 15</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	asymptomatic	<b>Negativo</b>
	<b>M 18</b>	neg		neg	1/40		Normale	Lieve dimagrimento Linfododi prescapolari aumentati	<b>Negativo</b>
<b>24</b>	<b>M 9</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓ TP ↓	Pallore delle mucose	<b>Negativo</b>
	<b>M 15</b>	neg		neg	1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/80		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 21</b>	neg		neg	1/160		RBC↓ PLT↓ TP ↓	Lieve dimagrimento	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	neg		neg	1/160		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>

	<b>M 30</b>	neg		neg	1/80		RBC↓ WBC↑ TP ↓	Scarse condizioni generali Pallore delle mucose	<b>Negativo</b>
<b>25</b>	<b>M 9</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 15</b>	neg		neg	1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 18</b>	neg		neg	1/160		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 21</b>	neg		neg	1/160		TP ↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	neg		neg	1/320		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 30</b>	neg		pos	1/160		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 33</b>	pos		pos	1/160		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
<b>26</b>	<b>M 9</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M 15</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/160		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	neg		neg	1/640		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
<b>27</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/160		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	neg		neg	1/640		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
<b>28</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/80		TP↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>

	<b>M24/M25</b>	neg		neg	1/320		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M30</b>	pos		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M33</b>	pos		pos	1/320		PLT↓	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
<b>29</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	1/40		TP↓	Linfonodi poplitei aumentati	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/80		WBC↑	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/80		TP↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	neg		neg	1/640		RBC↓ TP↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	1/80		PLT↓	Scarse condizioni corporee	<b>Negativo</b>
	<b>M 33</b>	neg		neg	<1/40		TP↓	Scarse condizioni corporee	<b>Negativo</b>
<b>30</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	1/40		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓	Lieve dimagrimento	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/40		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	neg		neg	1/320		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓ TP↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
<b>31</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	< 1/40		RBC↓ TP↓	Lieve dimagrimento Linfonodi poplitei aumentati	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/80		Normale	mild alopecia	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	neg		neg	1/640		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>

	<b>M30</b>	neg		neg	1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	1/40		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
<b>32</b>	<b>M9</b>	pos		pos	<1/40		RBC↓ TP↓ PLT↓	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
	<b>M15</b>	Pos (faint)		pos	1/40		TP↓ PLT↓	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
<b>33</b>	<b>M9</b>	neg		neg	1/40		TP↓	Blefarite	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	1/40		TP↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/40		WBC↑	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	neg		neg	1/320		RBC↓ TP↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	1/320		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
<b>34</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Linfonodi prescapolari aumentati	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	Pos (faint)		neg	1/40	(-)	PLT↓	asymptomatic	<b>Subpatente</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/80	(-)	Normale	asymptomatic	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	Pos(Faint)		neg	1/80	(-)	Normale	Lieve dimagrimento Alopecia tarso sinistro Depigmentazione del naso	<b>Subpatente</b>
	<b>M24/M25</b>	neg	(-)/(-)	neg	1/320	500/ND	Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Linfonodi prescapolari aumentati	<b>Negativo</b>

35	<b>M15</b>	Pos(Faint)		neg	1/40	(-)	TP↓	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	<1/40		WBC↑	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/40		RBC↓ TP↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (Faint)	2.9/(-)	neg	1/640	200/ND	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M 30</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓ TP↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
35	<b>M9</b>	Pos (faint)		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M15</b>	Pos (faint)		neg	1/40	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/40	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/80	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (Faint)	3.1/(-)	neg	1/640	500/ND	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M 30</b>	neg		neg	1/80		Normale	popliteal enlarged	<b>Negativo</b>
	<b>M 33</b>	pos		pos	1/40		RBC↓	Asintomatico	<b>Patente asintomatico</b>
37	<b>M9</b>	Pos (Faint)		neg	<1/40	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M15</b>	Pos (Faint)		neg	1/40	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	<1/40	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/40	(-)	Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (Faint)	2.4/(-)	neg	1/320	(-)/ND	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	pos		neg	<1/40		TP↓	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
38	<b>M9</b>	Pos (Faint)		neg	<1/40	(-)	RBC↓	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>

	<b>M24</b>	Diagnosi dopo morte naturale: enterite catarrale-emorragica e pneumopatia lobulare	<b>Deceduto</b>
--	------------	--	-----------------

### VACCINATI (continuo)

<b>Tattoo</b>	<b>Time</b>	<b>n-PCR</b>	<b>RT-PCR (P/ml - log10)</b>	<b>EMTM</b>	<b>IFAT (1/X)</b>	<b>IFAT DVTP (1/X)</b>	<b>Hemato / bioch</b>	<b>Clinical signs</b>	<b>CONCLUSION</b>
<b>39</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Lieve dimagrimento	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	1/80		PLT↓	Lieve dimagrimento	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/40		Normale	Ulcere e noduli	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (Faint)	3.2/(-)7	(-)/ND	1/320	500/ND	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	1/40		Normale		<b>Negativo</b>
<b>40</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/160		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/160		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M24/M25</b>	Pos (Faint)	(-)/(-)	neg	1/320	500/ND	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>
	<b>M30</b>	neg		neg	1/80		Normale	ulcers/nodules	<b>Negativo</b>
	<b>M33</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
<b>41</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M15</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M18</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>
	<b>M21</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>

	<b>M24/M25</b>	Pos (faint)	1.6/(-)	neg	1/640	200/ND	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>	
	<b>M30</b>	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>	
	<b>M33</b>	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>	
<b>42</b>	<b>M9</b>	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>	
	<b>M15</b>	neg		neg	1/40		PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>	
	<b>M18</b>	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>	
	<b>M21</b>	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>	
	<b>M24/M25</b>	Pos (faint)	3.2/(-)	neg	1/320	1000/ND	Normale	Asintomatico	<b>Subpatente</b>	
	<b>M30</b>	pos		pos	1/160		Normale	Asintomatico	<b>Patente sintomatico</b>	
	<b>M33</b>	pos		pos	1/640		RBC↓ PLT↓ TP↓	poor body condition	<b>Patente sintomatico</b>	
	<b>43</b>	<b>M 9</b>	neg		neg	<1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
		<b>M15</b>	neg		neg	1/80		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>
<b>M18</b>		neg		neg	1/160		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>	
<b>M21</b>		neg		neg	1/160	500	RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>	
<b>M24/M25</b>		pos (faint)	2.2/(-)	neg	1/320	200/ND	PLT↓	Asintomatico	<b>Subpatente</b>	
<b>M30</b>		neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	<b>Negativo</b>	
<b>M33</b>		neg		neg	1/40		RBC↓	Asintomatico	<b>Negativo</b>	

I risultati principali ottenuti nello studio possono essere così riassunti:  
 nel corso dello studio, 32/43 cani (74,42%) hanno sviluppato un'infezione subpatente; 15/43 (34,88%) hanno sviluppato un'infezione patente (il 46,87% di quelli che avevano contratto un'infezione sub patente) e 10/43 (23,26%) cani hanno sviluppato segni clinici riportabili a leishmaniosi canina. Tre cani del gruppo controllo sono deceduti in seguito alla malattia; nel gruppo dei vaccinati, invece, solo 1 cane è deceduto per cause riportabili alla malattia.

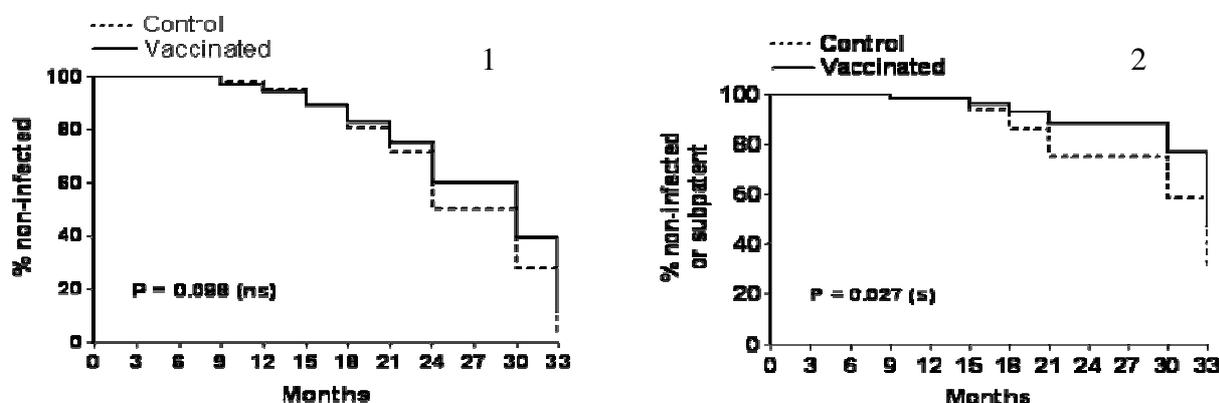
Nello specifico, la dimostrazione dell'avvenuta infezione (dimostrazione del parassita esclusivamente mediante tecnica PCR) e, soprattutto, del suo definitivo attecchimento (dimostrazione del parassita vivo e vitale in coltura), è avvenuta con la tempistica di seguito riportata:

<b>GRUPPO CONTROLLO</b>		
<b>Cane</b>	<b>Subpatente</b>	<b>Patente asintomatico</b>
2	M9	M9
3	M15	M15
4	M24	
5	M24	
6	M9	M9
7	M12	M15
8	M15	M18
9	M18	M18
10	M18	M21
11	M24	
13	M24	
15	M24	
16	M9	
17	M15	
18	M24	
19	M24	M 30
20	M24	
	<b>Tempo medio dall'esposizione alla prima infezione: 18,3 mesi</b>	<b>Tempo medio dalla prima infezione alla condizione di patente asintomatico: 1,9 mesi</b>

<b>GRUPPO VACCINATI</b>		
<b>Cane</b>	<b>Subpatent</b>	<b>Patent asymptomatic</b>
21	M9	M9
22	M18	M18
25	M30	M30
28	M30	M33

32	M9	M9
34	M15	
35	M15	
36	M9	M33
37	M9	
38	M9	
39	M24	
40	M24	
41	M24	
42	M24	M30
43	M24	
<b>Tempo medio dall'esposizione alla prima infezione: 18,2 mesi (no difference)</b>		<b>Tempo medio dalla prima infezione alla condizione di patente asintomatico: 4,7 mesi (2.8 mesi di ritardo)</b>

In particolare, 17 cani nel gruppo controllo hanno sviluppato un'infezione subpatente, evoluta in 8 casi in un'infezione chiaramente manifesta (patente). Nel gruppo dei vaccinati, 15 cani hanno avuto un'infezione subpatente che in 7 cani è evoluta in patente. La rappresentazione dell'evoluzione dello stato infettivo è stata ottenuta con due curve di Kaplan Meier (Fig. 3.5) nelle quali è stato riportato l'evento infezione subpatente (curva n. 1) ed infezione patente (curva n. 2) come endpoint. Nelle due curve è osservabile una differenza statisticamente significativa ( $P = 0.027$ ) tra il gruppo controllo ed il gruppo vaccinati, quando si consideri l'evento "infezione patente"; al contrario, nessuna differenza significativa ( $P = 0.098$ ) è emersa considerando il solo evento "infezione subpatente". Il tempo medio di definitivo attecchimento dell'infezione (infezione patente) è stato di 1.9 mesi nel gruppo controllo e di 4.7 mesi nel gruppo vaccinati.



**Figura 3.5.** Rappresentazione dell'evoluzione dello stato infettivo mediante curve di Kaplan Meier. Nella curva 1 è riportato l'evento infezione sub patente, nella curva 2 l'infezione patente come endpoint.

### **3.5.1 REAZIONI AVVERSE**

*I* cani ai quali è stato somministrato il vaccino non hanno presentato nessuna reazione avversa locale o sistemica, né immediatamente dopo l'inoculazione del farmaco né durante corso della sperimentazione; tali risultati hanno confermato quanto già dimostrato nella prova di sicurezza che costituisce parte integrante del dossier vaccinale.

### 3.6 DISCUSSIONE

*Per dare al lettore una più completa possibilità di analisi dei dati ottenuti, si ritiene utile, in fase di discussione, riportare le considerazioni che emergono dallo studio nella sua completezza e non soltanto quelle derivanti dai dati specifici presi in considerazione nella presente tesi. Questa parte, pertanto è del tutto sovrapponibile a quella descritta nella tesi della Dr.ssa Roberta De Santo.*

I dati ottenuti permettono di fare alcune considerazioni che, per quanto descritto in premessa, non possono essere ritenute definitive, in particolare per quanto riguarda la valutazione dell'efficacia del prodotto vaccinale.

Lo studio ha confermato la necessità di tempi particolarmente lunghi per seguire il decorso naturale dell'infezione leishmanica, soprattutto quando si voglia considerare lo sviluppo di malattia e non soltanto l'avvenuta infezione. Un dato particolarmente indicativo appare essere la perfetta sovrapposizione (18 mesi circa) nella dimostrazione dell'avvenuta infezione tra il gruppo controllo ed il gruppo dei cani vaccinati. In altri termini, il vaccino non è in grado di impedire che il parassita sia dimostrabile nell'organismo; tale evidenza sembra indicare che il vaccino non è completamente in grado di stimolare le difese immunitarie locali per distruggere il parassita al momento della sua deposizione nel derma. Questo dato, tuttavia, meritevole di studi molto più specifici ed approfonditi, non deve essere considerato come sicuramente negativo, in quanto la presenza del parassita, quando non associata a disseminazione sistemica dello stesso, potrebbe risultare uno stimolo necessario per attivare la memoria immunitaria. D'altra parte, uno studio clinico in Fase III deve necessariamente prevedere, per la sua riuscita, la scelta di un focolaio d'infezione ad elevata endemia che renda ben dimostrabile la differenza di risultati tra il gruppo controllo ed il gruppo dei vaccinati. Da questo punto di vista, la scelta di una zona dell'area vesuviana, già nota per le sue caratteristiche epidemiologiche, si è rivelata senz'altro felice, come dimostrato dall'elevatissima incidenza d'infezione che è stata del 74,42%. Le tecniche utilizzate, in buona parte derivanti da un protocollo già adottato in precedenza (Oliva et al., 2006) hanno permesso di seguire in maniera ottimale l'evoluzione dell'infezione. In particolare è stata confermata l'elevatissima sensibilità e precocità della n-PCR midollare, che ha permesso nel nostro caso la dimostrazione precoce dell'avvenuto contatto tra il parassita ed il cane. Anche in questo studio, tuttavia, analogamente a quanto già descritto (Oliva et al., 2006), la n-PCR midollare non può essere considerata la prova definitiva dell'avvenuta infezione, la quale è dimostrabile in maniera definitiva solo attraverso la dimostrazione in coltura del parassita. L'attecchimento dell'infezione è inevitabilmente seguito o accompagnato dalla dimostrazione di titoli anticorpali uguali o superiori al cut off considerato e progressivamente crescenti nel tempo. Anche la quantificazione della carica parassitaria, ottenuta

mediante tecnica RT-PCR non ha consentito di prevedere con anticipo l'evoluzione dell'infezione. L'analisi dei dati, infatti, ha dimostrato che, con la tecnica utilizzata nel presente studio, la carica parassitaria è chiaramente dimostrabile come significativa e crescente nel tempo in maniera direttamente proporzionale alla positività colturale e alla dimostrazione di titoli anticorpali chiaramente indicativi d'infezione.

Per quanto attiene alla possibilità che il vaccino blocchi il definitivo stabilirsi dell'infezione, sembra evidenziarsi, con le cautele dovute alla parzialità dei dati in nostro possesso che vi sia un trend significativamente diverso tra il gruppo controllo ed il gruppo dei vaccinati che lascia ritenere che il vaccino quanto meno rallenti in maniera significativa lo stabilirsi dell'infezione. Tale differenza emerge in maniera ancora più chiara quando si consideri la progressione dell'infezione verso lo stato di malattia. In definitiva, pertanto, il prodotto testato sembra assicurare una discreta protezione nei confronti dello stabilirsi dell'infezione ed una buona protezione dallo sviluppo della malattia.

La valutazione dei risultati della prova xenobiotica, infine, pur eseguita su un numero non elevato di cani e quindi da confermare in un campione più ampio, sembra dimostrare che anche i cani vaccinati, quando chiaramente malati, possono costituire un serbatoio attivo del parassita. E' indubbio, comunque, che la capacità media infettante dei vaccinati è significativamente più modesta rispetto ai cani del gruppo controllo. I dati ottenuti, inoltre, sembrerebbero dimostrare che la capacità infettante dei soggetti infetti ma non malati, indipendentemente dallo stato immunitario (vaccinati o non), è quasi del tutto ininfluenza ai fini della pericolosità del serbatoio d'infezione, condizione quest'ultima che potrebbe aprire ulteriori scenari in termini controllo epidemiologico.

## BIBLIOGRAFIA

- **Alexander J., Coombs GH., Mottram JC. (1998).** Leishmania mexicana cysteine proteinase-deficient mufor mice and potentiate a TH1 response. *J Immunol*;161:6794-6801.
- **Alvar J., Molina R., San Andres M., Tesouro M., Nieto J., Vitutia M., Gonzalez F., San Andres M.D.,Boggio J., Rodriguez F., Sainz A., Escacena C. (1994).** Canine leishmaniosis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 88, 371–378.
- **Alvar J., Gutierrez-Solar B., Pachon I., Calbacho E., Ramirez M., Valles R., Guillen J.L., Canavate C., Amela C. (1996).** AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem. *Clin. Dermatol.* 14:541-546.
- **Baneth G., Dank G., Keren-Kornblatt E., Sekeles E., Adini I., Eisenberger C.L., Schnur L.F., King R., Jaffe C.L. (1998).** Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:722–725.
- **Barman J.D. (1997).** Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 24: 684-703.
- **Bartges J.W., Osborne C.A., Felice L.J., Unger L.K., Chen M. (1995).** Influence of allopurinol and two diets on 24-hour urinary excretios of uric acid, xantine, and ammonia by healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* 56:595-599.
- **Bettini S. and Gradoni L. (1986).** Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implication for hum leishmaniasis. *Insect Sci. Appl.* 7: 241–245.
- **Bettini S., Gramiccia M., Gradoni L., Atzeni M.C. (1986).** Leishmaniasis in Sardinia. II. Natural infection of Phlebotomus perniciosus Newstead, 1911, by Leishmania infantum Nicolle, 1908 in the province of Cagliari. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80:458–459.
- **Bogdan C. (1997).** Of microbes and NO. *Behring Inst. Res. Commun.* 99:58-72.
- **Bongiorno G., Habluetzel A., Khouryc., Maroli M. (2003).** Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica* 88:109–116.
- **Buonaccorsi (1995).** Le malattie del cane e del gatto. Ed. “Essegi”, Bologna.
- **Borja Cabrera GP., da Silva VO., da Costa RT., Barbosa Reis A., Mayrink W., Genaro O., et al.(1999).** The FML-ELISA assay in diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med* 61(2):296-301.

- **Borja-Cabrera GP. (2000).** ‘An’alise do potencial diagn’ostico, progn’ostico e imunoprotetor do ant’igeno FML (Ligante de Fucose Manose) de Leishmania (L.) donovani, no calazar canino experimental e de ’area end^emica. *PhD thesis. Universidade Federal Fluminense. pp. 81-98*
- **Borja-Cabrera GP., Correia Pontes NN., da Silva VO., Paraguai de Souza E., Santos WR., Gomes EM., et al. (2002).** Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (S~ao Gonc, alo do Amarante). *Vaccine 20:3277-84.*
- **Borja-Cabrera GP., Cruz Mendes A., Paraguai de Souza E., Okada LYH., Trivellato FAA., Kawasaki JKA., et al.(2004).** Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine 22(18):2234—43*
- **Borja Cabrera GP., Santos FN., Miyashiro LM., Santos FB., Palatnik de Sousa CB. (2007).** Nucleoside hydrolase DNA vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine Congress. Celebrating 25 years of publication. 9—11 December, the Netherlands, vol. 1, p. 167.*
- **Buracco P., Abate R., Guglielmino R., Morello E. (1997).** Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with leishmania donovani infection in dog. *J. of Anim. Pract. 38: 29-30.*
- **Burns JM Jr., Shreffler WG., Benson DR., Ghalib HW., Badaro R., Reed SG. (1993).** Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.15;90(2):775-9.*
- **Brewster S., Aslett M., Barker DC. (1998).** Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitol Today.14(11):437-8.*
- **Britto C., Ravel C., Bastien P., Blaineau C., Pagès M., Dedet JP., Wincker P. (1998).** Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World Leishmania genomes. *Gene. 222(1):107-17.*
- **Capelli G., Baldelli R., Ferroglio E., Genchi C., Gradoni L., Gramiccia M., Maroli M., Mortarino M., Pietrobelli M., Rossi L., Ruggiero M. (2004).** Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parassitologia 46: 193–197.*

- **Cavirani S., Martelli P. (2003).** La vaccinazione. Un approccio filosofico e tecnico alla strategia sanitaria. In *le vaccinazioni in medicina veterinaria.strategie per la profilassi delle malattie degli animali domestici. edagricole*
- **Chance ML.; Walton BC. (1982).** Biochemical characterization of Leishmania.. *UNDP/World Bank/WHO: Geneva*
- **Palatnik-de-Sousa C.B., Gomes E.M., Paraguai-de-Souza E., Palatnik M., Kleber Luz K., Borojevic R. (1995).** Leishmania donovani: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & Hygiene 89, 390-393.*
- **Ciaramella P., Oliva G., Luna RD., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A., Persechino A. (1997).** A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. *Vet Rec. 22;141(21):539-43.*
- **Connell ND., Medina-Acosta E., McMaster WR., Bloom BR., Russell DG. (1993).** Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci U S A 15:11473-11477.*
- **Cruz A., Coburn CM., Beverley SM. (1991).** Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A;88:7170-7174.*
- **Cruz I., Morales M.A., Noguer I., Rodriguez A., Alvar J. (2002).** Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet 359:1124–1125.*
- **da Silva VO., Borja-Cabrera GP., Correia Pontes NN., Paraguai de Souza E., Luz KG., Palatnik M., et al. (2001).** A Phase III trial of Efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sˆao Gonc, alo do Amarante, RN). *Vaccine 19:1068-1081.*
- **Davoudi N., Tate CA., Warburton C., Murray A., Mahboudi F., Mc Master WR. (2005).** Development of a recombinant Leishmania major strain sensitive to ganciclovir and 5-fluoro cytosine for use a live challenge in clinical trials. *Vaccine 23:1170-1177*
- **Denerolle P., and Bourdoiseau G. (1999).** Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniosis (96 cases). *J. Vet. Int. Med. 13-413–415.*
- **Desjeux, P. (1996).** Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol. 14:417–423.*

- **Desjardins M. and Descoteaux A. (1997).** Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the leishmania lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 185:2061-2068.
- **Dujardin JC., Dujardin JP., Tibayrenc M., Timperman G., De Doncker S., Jacquet D., Arevalo J., Llanos-Cuentas A., Guerra H., Bermudez H., et al. (1995).** Karyotype plasticity in neotropical Leishmania: an index for measuring genomic distance among L. (V.) peruviana and L. (V.) braziliensis populations. *Parasitology.* 110 ( Pt 1):21-30.
- **Dye C., Vidor E., Dereure J. (1993).** Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol Infect.* 110:647-656.
- **Euzeby J. (1982).** Thérapeutique de la leishmaniose générale du chien. Actualité - Perspectives. *Revue de Médecine Vétérinaire* 133 :383-390.
- **Evans D.A. (1987).** Leishmania in vitro methods for parasites cultivation . Taylor A.E.E. and Baker J.R. eds ., pp. 58-59 ; *Academic Press, Londra and New York.*
- **Ferguson M.A., Brimacombe J.S., Cottaz S., Field R.A., Guther L.S., Homans S.W., McConville M.J., Mehlert A., Milne K.G., Ralton J.E., et al. (1994).** Glycosylphosphatidylinositol molecules of the parasite and the host. *Parasitology* 108 Suppl: S45-S54.
- **Ferrer L. (1992).** Leishmaniosis Kirk's current veterinary therapy XI, ed. W.B. Saunders. Philadelphia: 266-270.
- **Ferrer L., Juanola B., Ramos J., Ramis A. (1991).** Chronic colitis due to leishmanai infection in two dogs. *Veterinary Pathology* 28:342-343.
- **Foglia Manzillo V., Papparcone R., Cappiello S., De Santo R., Bianciardi P., Oliva G. (2009).** Resolution of tongue lesions caused by Leishmania infantum in a dog treated with the association miltefosine-allopurinol. *Parasit Vectors.* 26;2 Suppl 1:S6.
- **Font A., Durall N., Domingo M., et al. (1993).** Cardiac tamponate in a dog with visceral leishmaniasis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 29 95-121.
- **Font A., Roura X., Fondevila D., Closa J.M., Mascort J., Ferrer L. (1996).** Canine mucosal leishmaniasis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 32:131-137.
- **Gangneux J.P., Chau F., Sulahian A., Derouin F., Garin Y.J. (1999).** Effects of immunosuppressive therapy on murine Leishmania infantum visceral leishmaniosis *Eur. Cytokine Netw.* 10: 557-559.
- **Garcia-Alonso M., Blanco A., Reina D., Serrano F.J., Alonso C., Nieto C.G. (1996).** Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 18:617-623.

- **Garg R., Dube A. (2006).** Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 123(3):439-54.
- **Gaskin A.A., Schantz P., Jackson J., Birkenheuer A., Tomlinson L., Gramiccia M., Levy M., Steurer F., Kollmar E., Hegarty B.C., Ahn A., Breitschwerdt E.B. (2002).** Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J. Vet. Intern. Med.* 16:34–44.
- **Genaro O., Pinto JA., Da Costa CA., Franca-Silva JC., Costa RT., Silva JC., et al. (1996).** Phase III randomized double blind clinical trial on the efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:116.
- **Gonzalo RM., Del Real G., Rodriguez JR., Rodriguez D., Heljasvaara R., Lucas P., et al. (2002).** A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 15;20(7-8):1226-31.
- **Gradoni L., Di Muccio T., Scalone A., Gramiccia M. (2010).** La leishmaniosi nel Sud Europa: importazione di parassiti ed espansione dei focolai endemici. In *Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione. Edizioni Veterinarie (MI)*
- **Gramiccia M., Gradoni L. (2005).** The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35:1169–1180.
- **Guler M.L., Gorham J.D., Hsieh C.S., Mackey A.J., Steen R.G., Dietrich W.F., Murphy K.M. (1996).** Genetic susceptibility to *Leishmania*: IL-12 responsiveness in TH1 cell development. *Science* 271:984-987.
- **Handman E. (2001).** Leishmaniasis: Current Status of Vaccine. *Development Clinical Microbiology reviews* 14:229–243.
- **Hoskins T. W., Davies J. R., Smith A. J., Miller C. L., Allchin A. (1979).** Assessment of inactivated influenza-A vaccine after three outbreaks of influenza A at Christ's Hospital. *Lancet* i:33–35
- **Jardim A., Funk V., Caprioli R.M., Olafson R.W. (1995).** Isolation and characterization of the *leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem. J.* 305: 307-313.
- **Keenan CM., Hendricks LD., Lightner L., Webster HK., Johnson AJ. (1984).** Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology *Vet Pathol.* 21(1):74-9.

- **Kelly JM., Law JM., Chapman CJ., Van Eys GJ., Evans DA. (1991).** Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 46:253-263.
- **Kontas V.J. and Koutinas A.F. (1993).** Old world canine leishmaniasis. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* 15:949-960.
- **Koutinas AF., Scott DW., Kantos V., et al. (1992).** Skin lesions in canine Leishmaniasis (Kala-azar): A clinical and histopathological study of 22 spontaneous cases in Greece. *Vet. Dermatol.* 3:121-130.
- **Koutinas A.F., Polizopoulou Z.S., Saridomichelakis M.N. (1999).** Clinical considerations on canine visceral leishmaniosis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35:376–383.
- **Kreutzer R.D., Corredor A., Grimaldi Jr. G., Grogl M., Rowton E.D., Young D.G., Morales A., McMahon-Pratt D., Guzman H., Tesh R.B. (1991).** Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida:Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44:662–675.
- **Krobitsch S., Clos J. (1999).** A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones* 4:191-198.
- **Lamothe J. (1997).** A new prospect on canine leishmaniasis: treatment with amphotericin B. *Prat. Med. Churg. Anim. Comp.* 32:133-141.
- **Lemesre JL. (1994).** Method for the culture in vitro of different stages of tissue parasites. *International publication WO94/26899.*
- **Lemesre JL., Holzmuller P., Cavaleyra M., Bras-GoncalvesR., Hottin G., Papierok G. (2005).** Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigote. *Vaccine* 23:2825-2840.
- **Lemesre JL., Holzmuller P., Bras-GoncalvesR., BourdiseauG., Hugnet C., Cavaleyra M., Papierok G (2007).** Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAP-MDP vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine* 25:4223-4234.
- **Lopez R., Lucena R., Novales M., Ginel P.J., Martin E., Molleda J.M. (1996).** Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B.* 43:469-474.
- **Mancianti F. (2001).** Diagnosi sierologica della Leishmaniosi canina. *Incontro SIDEV Leishmaniosi canina, vol. 2, pp. 3-, Cremona.*

- **Manetti R., Parronchi P., Giudizi M.G., Piccinni M.P., Maggi E., Trinchieri G., Romagnani S. (1993).** Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) induces T helper Type 1 (Th 1)- specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J. Exp. Med.* 177:1199-1204.
- **Manuel J. (1990).** Macrophage-parasite interactions in Leishmania infections. *J. Leuckoc. Biol.* 47:187-193.
- **Marcato P.S., Macri B., Burdisso R. (2002).** Granulomi da protozoi in: Paolo Stefano Marcato. Patologia sistematica veterinaria. *Edagricole, Bologna.*
- **Margarito J.M., Ginel P.J., Molleda J.M., Moreno P., Novales M., Lopez R. (1994).** Haemangiosarcoma associated with leishmaniasis in three dogs. *Vet. Rec.* 134:66-67.
- **Mary C., Faraut F., Lascombe L., Dumon H. (2004).** Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J Clin Microbiol* 42:5249-5255.
- **Maroli M. (1989).** Il vettore. In leishmaniosi Canina. *Monografia Scivac:11-16.*
- **Maroli M., Gradoni L., Oliva G., Castagnaro M., Crotti A., Lubas G., Paltrinieri S., Roura X., Zatelli A., Zini E. (2009).** Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte III: Prevenzione. *Veterinaria, Anno 23, n. 4, Agosto 2009*
- **Maroli M., Gramiccia M., Gradoni L. (1987).** Natural infection of sandfly *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 596–598.
- **Maroli M., Gramiccia M., Gradoni L., Ready P., Smith D.F., Equino C. (1988).** Natural infections of phlebotomine sandflies with Trypanosomatidae in central and south Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:227–228.
- **Maroli M., Gramiccia M., Gradoni L., Troiani M., Ascione R. (1994).** Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* with an enzymatic variant of *Leishmania infantum* in the Campania region of Italy. *Acta Trop.* 57:333–335.
- **Maroli M., Rossi E., Rinaldi L., Musella V., Carbone S., Veneziano V., Foglia Manzillo V., Cappiello S., Oliva G., Cingoli G., Gradoni L. (2006).** An entomological and serological survey of canine leishmaniasis along the coastal and the Apennine sides of the Mt. Vesuvius (Campania region, southern Italy). *XXIV Congresso SOIPA, Messina 21-24 giugno 2006, Parassitologia* 48:323.
- **Martinez S., Looker D.L., Berens R.L., Marr J.J. (1988).** The synergistic action of pyrazolopyrimidines and pentavalent antimony against *Leishmania donovani* and *L. braziliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39:250–255.

- **McNeely T.B., Rosen G., Londner M.V., Turco S.J. (1989).** Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite leishmania. *Biochem. J.* 259:601-604.
- **McMahon-Pratt D., Rodriguez D., Rodriguez JR., Zhang Y., Manson K., Bergman C., Rivas L., Rodriguez J.F., Lohman K.L, RN.H., Esteban M. (1993).** Recombinant vaccinia viruses expressing GP-46/M-2 protect against Leishmania infection. *Infect Immun;*61:3351-3359
- **Medina-Acosta E., Karess R.E., Schwartz H., Russell D.G. (1989).** The promastigote surface protease (gp63) of leishmania is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37:263-273.
- **Mendoza-Leon A., Luis L., Fernandes O., Cupolillo E., Garcia L. (2002).** Molecular markers for species identification in the Leishmania subgenus Viannia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 (Suppl 1): S65–S70.
- **Merlen T., Sereno D., Brajon N., Rostand F., Lemestre JL. (1999).** Leishmania spp.: Completely defined medium without serum and macromolecules (CDM/LP) for thr continuous in vitro cultivation of infective promastigote forms. *Am J Trop Med Hyg* 60:41-50
- **Miró G., Oliva G., Cruz I., Cañavate C., Mortarino M., Vischer C., Bianciardi P.(2009).** Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol.* 20:397-404.
- **Mohebbali M., Khamesipour A., Mobedi I., Zarei Z., Fesharki RH. (2004).** Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved Leishmania major vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine;*22:4097-4100.
- **Moody AH., el-Safi SH. (1996).** A latex agglutination test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan .*Trans R Soc Trop Med Hyg.* 90:522.
- **Moreno J. and Alvar J. (2002).** Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18:399-405.
- **Moreno J., Nieto J., Masina S., Cănavate C., Cruz I., Chicharro C., et al. (2007).** Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine;*25:5290-5300
- **Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. (1986).** Two types of murine helper T cells clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357.

- **Mougneau E., Altare F., Wakil A.E., Zheng S., Coppola T., Wang Z.E., Waldmann R., Locksley R.M., Glaichenhaus N. (1995).** Expression cloning of a protective Leishmania antigen. *Science* 268:563-566.
- **Murray H.W. and Edelson P.J. (1981).** Susceptibility of Leishmania to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J. Exp. Med.* 153: 1302- 1315.
- **Murray H.W. (1990).** Effect of continuous administration of interferon- $\gamma$  in experimental visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 161: 992-994.
- **Muyombwe A., Olivier M., Harvie P., Bergeron MG., Ouellette M., papadopoulou B. (1998).** Protection against Leishmania major challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. *J Infect Dis* 177:188-95.
- **Natale A. (2004).** La leishmaniosi in Italia. *Obiett. Doc. Vet.* 12: 23-28.
- **Nogueira FS., Moreira MAB., Borja Cabrera GP., Santos FN., Menz I., Parra LE., et al. (2005).** Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of Leishmania parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* 23:4805-4810
- **Oliva G., Dvm XR., Crotti A., Maroli M., Castagnaro M., Gradoni L., Lubas G., Paltrinieri S., Zatelli A., Zini E. (2010).** Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.*1;236(11):1192-8. *Review*
- **Oliva G., Roura X., Crotti A., Maroli M., Castagnaro M., Luigi Gradoni L., Lubas G., Paltrinieri S., Zatelli, A., Zini E. (2010).** Guidelines for treatment of leishmaniasis in dog. *JAVMA* 236
- **Oliva G., Foglia Manzillo V., Fiorentino E., (2010).** In: Leishmaniosi canina:recent acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione. *Edizioni veterinarie (MI)*
- **Oliva G. (2002).** Atti Aggiornamenti sulla leishmaniosi canina. Calenzano (FI), 3 Febbraio (incontro organizzato dall'AToVeLP).
- **Oliva G., Gradoni L., Ciaramella P., De Luna R., Cortese L., Orsini S., Davidson R.N., Persechino A. (1995).** Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dog naturally infected with Leishmania infantum. *J. Antimicrob. Chemother.* 36:1013–1019.
- **Oliva G., Scalone A., Foglia Manzillo V., Gramiccia M., Pagano A., Di Muccio T. and Gradoni L. (2006).** Incidence and Time Course of Leishmania infantum Infections Examined by Parasitological, Serologic, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naïve

- Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 1318–1322.
- **Ortiz G., Navarro M., Segovia M. (1995).** Location in the source chromosome of the 180-kb minichromosome of *Leishmania major* and characterization of the novel junction. *Mol Biochem Parasitol.* 71:153-61
  - **Owens S.D., Oakley D.A., Marryott K., Hatchett W., Walton R., Nolan T.J., Newton A., Steurer F., Schantz P., Giger U. (2001).** Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219:1076–1083
  - **Palatnik de Sousa CB., Bunn Moreno MM., Paraguai de Souza E., Borojevic R. (1994).** The FML vaccine (fucose-mannose ligand) protects hamsters from experimental kala-azar. *Ciência e Cultura J Braz Assoc Adv Sci;*46:290-296.
  - **Palatnik de Sousa CB., Gomes EM., Paraguai de Souza E, Luz K., Palatnik M., Borojevic R. (1995)** *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:390-393.
  - **Palatnik de Sousa CB., Barbisa Ade F., Oliveira SM., Nico D., Bernardi RR., Santos WL., Rodrigues MM., Soares I., Borja-Cabrera GP. (2008).** FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from- second generation to synthetic vaccine. *Expert Rev Vaccines* 8:33-51.
  - **Paltrinieri S., Solano-Gallego L., Fondati A, Lubas G., Gradoni L., Castagnaro M.,Crotti A., Maroli M., Oliva G., Roura X., Zatelli A., Zini E. (2010).** Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*: 236,
  - **Pampiglione S. and Bettini S. (1981).** Bibliografia delle Leishmaniosi. *Ann. Ist. Sup. Sanità* 17:1–150
  - **Papadopoulou B., Roy G., Breton M., Kunding C., Dumas C., Fillion I., Singh AK, Olivier M, Ouellette M. (2002).** Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioperin transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun* 70:62-68
  - **Pena M.T., Roura X.,Davidson M.G., (2000).** Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs : 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol*, 3:35-41
  - **Peters W. and Killick-Kendreck R. (eds) (1987).** The leishmaniasis in biology and medicine. *Academic Press, London.*

- **Poli A., Sozzi S., Guidi G., Bandinelli P., Mancianti F. (1997).** Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 71: 263-271
- **Pirmez C., Yamamura M., Uyemura K., Paes-Oliveira M., Conceicao-Silva F., Modlin R.L. (1993).** Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest* 91: 1390-1395.
- **Poli G. (1988).** Microbiologia e immunologia. Utet Torino
- **Poli G. and Cocilovo A. (1996).** Microbiologia e immunologia veterinaria. Utet
- **Pozio E., Gradoni L., Gramoccia M. (1985).** La leishmaniose canine en Italie de 1910 a 1983 m. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60:543–553.
- **Pugliese A., Niuitta P.P., Meli F., Pantano V. , Giudice E., (1992) .** Incidenza di lesioni oculari in corso di Leishmaniosi del cane. *Atti S.I.S. Vet.* 46:1529-1533
- **Rachamim N. end Jaffe CL. (1993).** Pure protein from Leishmania donovani protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Immunol* 150:2322-2331.
- **Rafati S., Nakhaee A., Taheri T., Taslimi Y., Darabi H., Eravani D., Sanos S, Kaye P, Taghikhani M, Jamshidi S, Rad MA. (2005).** Protective vaccination agaisnt canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases typeI and Type II of L. infantum. *Vaccine* 23:3716-3725.
- **Ramírez JR., Gilchrist K., Robledo S., Sepulveda JC., Moll H , Soldati D , et al. (2001).** Attenuated Toxoplasma gondii ts-4 mutants engineered to express the Leishmania antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine* 20:455-461.
- **Ramiro MJ., Zarate JJ., Hanke T., Rodriguez D., Rodriguez JR., Esteban M., Lucientes J., Castillo J.A., Larraga V. (2003)** Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA vaccine and vaccinia recombinant vectors expresssing LACK. *Vaccine* 21:2474-2484.
- **Reed S.G. and Scott P. (1993).** T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Op. in Immunol.* 5 524-531.
- **Ribeiro J.M. (1995).** Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* 4:143-152.
- **Rodríguez-Cortés A., Ojeda A., López-Fuertes L., Timón M., Atlet L., Solano-Gallego L., Sánchez-Robert E., Francino O., Alberol J. (2007).** Vaccination with plasmid

DNA encoding KMP11, TRYP, LACK, and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25, 7962-7971.

- **Roura X., Sanchez A. and Ferrer L. (1999).** Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet. Rec.* 144: 262-264.
- **Rüfenacht S., Sager H., Müller N., Schaerer V., Heier A., Welle M.M., Roosje P.J. (2005).** Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *Vet. Rec.* 156: 542-545.
- **Sacks D.L. and Perkins P.V. (1984).** Identification of an infective stage of *Leishmania promastigotes*. *Science* 223:1417-1419.
- **Safjanova V.M. (1991).** *Parassitologia* 33. Suppl 1:505-511.
- **Sánchez-Vizcaíno J.M.** Corso di introduzione alla immunologia suina. [http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun\\_it/octavo2.htm](http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun_it/octavo2.htm).
- **Santos WR., de Lima VMF., Paraguai de Souza E., Bernardo RR., Palatnik M., Palatnik de Sousa CB. (2002).** Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*;21:30-43.
- **Santos WR., Aguiar IA., Paraguai de Souza E., de Lima VFM., Palatnik M., Palatnik-de-Sousa CB. (2003).** Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FMLvaccine. *Vaccine* 21:4668-76.
- **Santos FN., Borja-Cabrera GP., Miyashiro LM., Grechi J., Reis AB., Moreira MA., et al. (2007).** Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine*;25:6176-90.
- **Slappendel RJ and Ferrer L. (2003).** Leishmaniosi. In Greene C.E. (ed): Malattie infettive del Cane e del gatto. Antonio Delfino Editore, pagg. 450-458.
- **Slappendel RJ. and Teske E. (1997).** The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime<sup>®</sup>) in dogs with leishmaniosis. *Vet. Q.* 19, 10–13.
- **Solano-Gallego L., Koutinas A., Miró G., Cardoso L., Pennisi MG., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G. (2009).** Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosi. *Vet Parasitol.* 165:1-18. Review.
- **Souza AE., Barres PA., Coombs GH., Mottram JC. (1994).** Null mutants for the *Imcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 63:213-220.
- **Streit JA., Recker TJ., Donelson JE., Wilson ME. (2000).** BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. *Exp Parasitol* 94:33-41.

- **Sundor S., Rosenkaimer F., Murray H.W. (1994).** Successful Treatment of refractory visceral leishmaniasis in India using antimony plus interferon- $\gamma$ . *J. Infect. Dis.* 170:6559-6562.
- **Theodos C.M., Ribeiro J.M., Titus R.G. (1991).** Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on Leishmania infection in mice. *Infect Immun.* 59:1592-1598.
- **Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W. (1998).** *Parassitologia Veterinaria*. Edizione italiana a cura di Claudio Genchi. UTET
- **Valenzuela JG., Belkaid Y., Garfield MK., Mendez S., Kamhawi S., Rowton ED., Sacks DL., Ribeiro JM. (2001).** Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med.* 194:331-42.
- **WHO (1993).** The Leishmaniases. CTD/MIP/WP.93.8, WHO/HQ. Geneva.
- **WHO (1997).** Special programme for research and training in tropical disease (tDR). Guidelines for the evaluation of Plasmodium falciparum vaccines in populations exposed to natural infections. *TDR/MAL/VAC. World Health Organization, Geneva, Switzerland*
- **Wincker P., Ravel C., Blaineau C., Pages M., Jauffret Y., Dedet JP., Bastien P. (1996).** The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.* 1;24(9):1688-94
- **Xu D., McSorley SJ., Chatfield SN., Dougan G., Liew FY. (1995).** Protection against Leishmania major infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated Salmonella typhimurium (AroA- AroD-). *Immunology*;85:1-7.
- **Yang DM., Fairweather N., Button LL., McMaster WR., Kahl LP., Liew FY. (1999).** Oral Salmonella typhimurium (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J Immunol* 145:2281-5.