

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE E FARMACO-  
TOSSICOLOGICHE VETERINARIE

XXIV CICLO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE VETERINARIE  
SEZIONE DI CLINICA MEDICA



TESI DI DOTTORATO IN  
CONFRONTO TRA DIFFERENTI METODI DIAGNOSTICI IN CORSO DELLA  
LEISHMANIOSI DEL CANE

Relatore:

Laura Manna

Candidata:

Valentina Cipri

## INDICE

Introduzione	pag. 3
1 - L'agente Eziologico	pag. 5
1.1- Classificazione	pag. 5
1.2 – Morfologia	pag. 10
1.3 - Caratteristiche genomiche	pag. 11
1.4 - Ciclo biologico	pag. 13
2 - Il vettore	pag. 16
2.1 – Classificazione	pag. 16
2.2 – Morfologia	pag. 18
2.3 - Presenza nel flebotomo “Infezione”	pag. 19
2.4 - Il ciclo vitale	pag. 22
2.5 - Attività ed abitudini	pag. 23
2.6 - Distribuzione in aree endemiche	pag. 24
3 - La trasmissione	pag. 29
4 – Patogenesi	pag. 33
4.1 - Patogenesi nel cane	pag. 41
5 -Sintomatologia	pag. 46
6- Aspetti diagnostici	pag. 51
7-Terapia	pag. 69
8-Parte sperimentale	pag. 71
8.1-Costruzione dei plasmidi di espressione con pGEM-T easy vector	pag 72
8.2- Microtitolazione mediante PCR real time	pag 78
9-Terreni e reagenti utilizzati	pag.82
10- Risultati e conclusioni	pag. 85
11-Bibliografia	pag 87

## Introduzione

La leishmaniosi è una malattia protozoaria, infettiva e contagiosa a carattere zoonosico, causata da diverse specie del genere *Leishmania*. Inizialmente è stata segnalata in esseri umani e solo in un secondo tempo nel cane. Negli anni a seguire la malattia è stata riscontrata in altre specie animali domestiche e selvatiche amplificando così il ventaglio dei serbatoi possibili.

La leishmaniosi è una malattia parassitaria a carattere zoonosico causata da diverse specie di protozoi, appartenenti al genere *Leishmania* e trasmessa dalla puntura di un flebotomo. Questi protozoi sono stati osservati per la prima volta da Cunningham in India nel 1885 in persone affette da “Bottone d’Oriente”, una forma cutanea sostenuta da *Leishmania Tropica*. Nel 1903, il patologo londinese Leishman riscontrò microrganismi identici in persone affette da “Kala-azar”, una forma viscerale sostenuta da *Leishmania donovani*. La prima segnalazione di leishmaniosi canina risale al 1908 da parte di Nicolle e Comte, cui seguirono ulteriori segnalazioni anche in altre specie animali come i carnivori selvatici (volpe) ed i roditori (ratto).

La leishmaniosi è ampiamente diffusa in molti paesi del mondo a clima tropicale, subtropicale e mediterraneo, registrando un costante aumento nella popolazione umana con 1-2 milioni di casi nuovi/anno, di cui circa 600.000 in forma viscerale ed i restanti a localizzazione cutanea (WHO 2001). Circa il 90% dei casi di leishmaniosi viscerale si riscontra in India (soprattutto nelle pianure del Gange e Bramaputra), Bangladesh, Nepal, Sudan e Nord-est del Brasile (Desjeux, 1996). Le forme cutanee prevalgono nel Medio Oriente (Afghanistan, Arabia, Siria, Iran), America centrale e meridionale, Africa ed Europa.

In Europa, sono maggiormente colpite le aree del bacino del Mediterraneo dove la malattia assume carattere endemico ed è sostenuta esclusivamente da *Leishmania infantum*, di cui il cane è il principale serbatoio. In Italia l’infezione è presente lungo le coste tirreniche e adriatiche, nelle isole dove assume un’evoluzione enzootica e nelle regioni settentrionali dove è stata accertata la recente segnalazione di focolai localizzati in zone ritenute completamente indenni come il Veneto, l’Emilia Romagna, il Piemonte, il Trentino e la Lombardia (Natale, 2004).

La diffusione della malattia è influenzata da molti fattori, quali: l’ambiente (densità dei flebotomi nelle aree endemiche, altitudine e caratteristiche geologiche del territorio), il

clima (temperatura, tasso d'umidità), condizioni socio-sanitarie (malnutrizione, incidenza nella popolazione umana di immunodeficienza acquisita, elevata concentrazione di animali infetti, randagismo), mancanza di presidi immunizzanti (vaccini) efficaci sia nell'uomo che negli animali.

L'infezione colpisce cani di tutte le razze ed età; l'incidenza può essere legata alle abitudini di vita: i cani di grossa taglia ed in particolare i cani da caccia sono più spesso colpiti poiché vivono all'aperto, e nei soggetti con più di nove mesi di età, per il lungo periodo d'incubazione di questa malattia (Denerolle, 1996; Koutinas, 1999).

La minore incidenza della patologia nei cani di piccola taglia è probabilmente in relazione all'habitat estremamente domestico di questi animali, con minore possibilità di contatto con i flebotomi, soprattutto nelle ore notturne.

## 1 - L'agente eziologico

L'agente causale è un protozoo appartenente al genere *Leishmania*, parassita intracellulare obbligato del sistema reticolo-istocitario dell'uomo e di altri mammiferi(domestici e selvatici), che viene trasmesso ad opera di un vettore biologico, il flebotomo.

**Cenni storici:** Le leishmanie sono state viste per la prima volta da Cunningham, in India, nel 1885 in persone affette dal “Bottone d'Oriente”. Nel 1903 Marchand osservò dei parassiti, simili a quelli visti da Cunningham, in strisci di milza di un cinese morto in Germania di “Kala-azar”; nello stesso anno e quasi contemporaneamente, Leishman e Donovan descrissero dei microrganismi identici ritrovati in persone ammalate di “Kala-azar”. Nel 1909 Linderberg isolò dalle ulcere cutanee di un brasiliano un parassita denominato da Vianna (1911) *Leishmania braziliensis*.

La prima segnalazione di leishmaniosi canina è del 1908 (Nicolle e Comte); in seguito si sono avute diverse altre segnalazioni sulla presenza delle leishmanie in altre specie animali.

Per quanto riguarda l'agente vettore del parassita, il primo a sospettare i flebotomi fu Pressat nel 1905.

Nei primi anni del 1940, Swaminath, Shortt e Anderson in India e Adler e Ber in Palestina hanno dimostrato la trasmissione di *L. donovani* e *L. Tropica* (probabilmente *L. major*) da flebotomi (WHO - Technical Report Series 949, 2010).

### 1.1 - Classificazione

Dal punto di vista morfologico le varie specie di *Leishmania* sono indistinguibili ma causano manifestazioni cliniche che evolvono in forma differente. Lo studio tassonomico riveste un ruolo importante nella comprensione dei vari ambiti(evoluzione della malattia, epidemiologia, fattori di patogenicità, ecc....) di studio delle leishmaniosi. Inoltre, oggi, sono presenti in letteratura molti studi che affiancano alle classiche tecniche adoperate per la classificazione delle specie, le metodiche molecolari basate sull'analisi del DNA.

Dalla creazione del genere *Leishmania* effettuata da Ross (1903), il numero di specie descritte è costantemente aumentato.

Le prime classificazioni (1916-1987) si basavano su una gerarchica di tipo Linneana. Successivamente, Lainson and Shaw divisero il genere *Leishmania* in due sottogeneri.

Poiché le diverse specie sono difficilmente distinguibili per loro morfologia, si sono utilizzati altri criteri per la loro identificazione e classificazione. In particolare, Lumsden (1974) distinse tra i caratteri estrinseci, “fenotipici” del parassita, (come, ad esempio, le caratteristiche cliniche del soggetto infettato, la distribuzione geografica, il comportamento in cultura, in animali da laboratorio o vettori), e quelli intrinseci (come ad es. risvolti immunologici, criteri biochimici o molecolari).

Attualmente è da ritenersi valida la classificazione del genere *Leishmania*, elaborata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), che tiene conto della biologia del protozoo, della specie del flebotomo implicato nella trasmissione e, soprattutto, del corredo enzimatico del parassita.

Il genere *Leishmania spp.* appartiene al **Phylum:** *Sarcomastigophora*, **Subphylum:** *Mastigophora*, **Classe:** *Zoomastigophora*, **Ordine:** *Kinetoplastida*, **Sottordine:** *Trypanosomatinae*, **Famiglia:** *Trypanosomatidae*, **Genere:** *Leishmania*.

Il genere *Leishmania* è a sua volta suddiviso, sulla base dello sviluppo nel flebotomo, in due sottogeneri ai quali appartengono diverse specie:

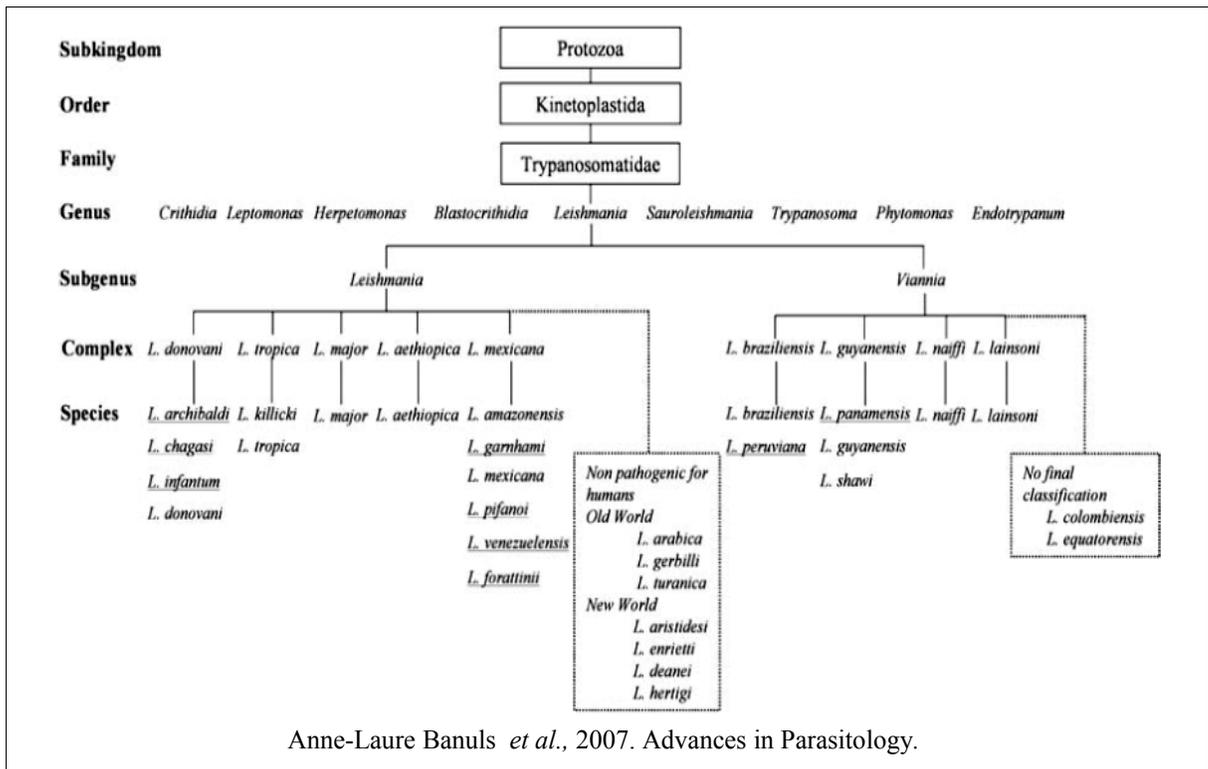
**Sottogenere *Leishmania***, presente sia nel Vecchio e il Nuovo Mondo, le cui specie sono: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica* (Vecchio Mondo), *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis* (Nuovo Mondo)

**Sottogenere *Viannia***, limitato al Nuovo Mondo, le cui specie sono: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruvian*.

In **Figura 1** è rappresentato lo schema tassonomico del genere *Leishmania* in cui sono evidenziati non solo i sottogeneri ma anche i *complex*<sup>1</sup> a cui appartengono le diverse specie.

---

<sup>1</sup> Il genere *Leishmania spp.* comprende numerose specie patogene per l'uomo; sovrapposizioni morfologiche, metaboliche ed epidemiologiche hanno portato ad una classificazione che raggruppa diverse specie in “*complex*” o complessi, definiti sulla base dell'estrinsecazione clinica della patologia indotta. Ad esempio:  
*Leishmania donovani complex*: comprende gli agenti eziologici di forme viscerotrope del Vecchio e del Nuovo Mondo come *L. donovani* responsabile in Asia del kala-azar dell'uomo (non è una zoonosi). In Italia, l'unica specie presente è *L. infantum*. Questa specie è l'agente eziologico nell'uomo di forme viscerali, ma anche cutanee, e nel cane della leishmaniosi canina;  
*Leishmania tropica complex*: agenti di forme cutanee del Vecchio Mondo come *L. tropica*, presente nel bacino mediterraneo, in Medio Oriente, in India, e in Africa occidentale determina la forma secca del Bottone d'Oriente la quale non è una zoonosi;



**Figura 1:** è basata sullo schema pubblicato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 1990) con alcune aggiunte prese dalla letteratura, mostra la tassonomia del genere della *Leishmania*. Le specie sottolineate sono o sono state messe in discussione.

Da quanto si può evincere dalla **Tabella 1**, la specie di *Leishmania* determina fortemente come la malattia evolverà (WHO, Technical Report Series 949, 2010). In particolare, in tabella vengono mostrati i tipi di malattia, nell'uomo (cutanea, mucocutanea, cutanea diffusa e viscerale) in relazione alla specie.

E' quindi essenziale conoscere l'identità del parassita in ogni territorio, poiché questa conoscenza ha delle implicazioni in studi epidemiologici, di controllo e trattamento della malattia (WHO, Technical Report Series 949, 2010).

Allo stato attuale, per gli studi tassonomici, l'elettroforesi degli isoenzimi, isoenzimatica, rimane la tecnica più utilizzata. Essa è considerata, ancora oggi, standard di riferimento ("gold standard") per l'identificazione e la caratterizzazione del genere *Leishmaniam* (WHO, Technical Report Series 949, 2010).

*Leishmania major complex*: *L. major* diffusa nel mediterraneo africano, Africa centro occidentale, Medio Oriente ed Asia centrale agente causale della forma umida del Bottone d'Oriente, zoonosi con epidemiologia rurale, i *reservoir* sono i roditori selvatici;

*L. aethiopica complex*: *L. aethiopica* nell'Africa dell'est causa la forma secca del Bottone d'Oriente, con tendenza alla forma cutanea disseminata; zoonosi questa con diffusione silvestre. I *reservoirs* sono le procavie;

*Leishmania mexicana complex*: nelle sue tre sottospecie determina una zoonosi nel Nuovo Mondo con forme cutanee nell'uomo. I *reservoirs* sono i roditori selvatici ed opossum.

*Leishmania brasiliensis complex*: agenti di forme muco-cutanee nel Nuovo Mondo; zoonosi relativamente benigna a ciclo epidemiologico rurale. Ha il cane come serbatoio.

Human-infective species of the <i>Leishmania</i> genus		
Old World species	New World species	Disease type
<b><i>L. major</i> complex</b>	<b><i>L. mexicana</i> complex</b>	Cutaneous
<u><i>L. (L.) major</i></u>	<u><i>L. (L.) mexicana</i></u>	
<i>L. (L.) tropica</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	
<i>L. (L.) aethiopica</i>	<i>L. (L.) pifanoi</i>	
	<i>L. (L.) venezuelensis</i>	
	<b><i>L. (Viannia) subgenus</i></b>	
	<u><i>L. (V.) braziliensis</i></u>	
	<i>L. (V.) panamensis</i>	
	<i>L. (V.) guyanensis</i>	
	<i>L. (V.) peruviana</i>	
	<i>L. (V.) lansoni</i>	
	<u><i>L. (V.) braziliensis</i></u>	Mucocutaneous
<i>L. (L.) aethiopica</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Diffuse cutaneous
	<i>L. (L.) pifanoi</i>	
<b><i>L. donovani</i> complex</b>		Visceral
<i>L. (L.) donovani</i>		
<u><i>L. (L.) infantum</i>*</u>	<i>L. (L.) chagasi</i> *	

Smith *et al.*, 2007. Int J Parasitol.

**Tabella 1:** mostra le specie del genere *Leishmania* che sono infettive per l'uomo nel Vecchio e Nuovo Mondo. I principali complessi delle specie ed il sottogenere sono evidenziati in grassetto, le specie di cui è disponibile la sequenza genomica completa sono sottolineate. Con l'asterisco sono indicate le specie che possono anche essere associate a leishmaniosi cutanee.

Questa metodica, però, lunga e complessa, richiede laboratori e personale specializzato, motivo per cui esistono solo pochi istituti che ne garantiscono l'esecuzione ed il servizio. Al fine di eseguire l'analisi, è richiesto l'isolamento e la coltivazione in vitro del parassita. Con l'analisi isoenzimatica è stato dimostrato che nel bacino del Mediterraneo, ed anche in Italia, il ceppo principale, responsabile della leishmaniosi umana e canina, è rappresentato dalla *L. infantum* con variante enzimatica(zimodema) Montpellier 1(MON 1) e Montpellier 72 (MON 72) (Pratlong *et al.*, 1995).

In questi ultimi anni, tuttavia, sono disponibili varie metodiche molecolari, basate sull'analisi del DNA, in particolare sull'analisi dei microsatelliti<sup>2</sup>. Queste metodiche, una volta standardizzate, possono offrire l'opportunità di migliorare e meglio discriminare l'identificazione e la caratterizzazione dei ceppi circolanti.

La necessità di effettuare tipizzazioni genetiche interspecifiche, nasce dall'esigenza di valutare se, una migliore conoscenza genetica dei ceppi può aiutare a stabilire una relazione con la malattia. Ciò potrebbe avere delle ricadute sulla diagnosi, sulla terapia, sulla prognosi, sull'epidemiologia, e sulla prevenzione e controllo della patologia.

Inoltre, un grosso vantaggio è che tali metodi non necessitano, in modo imprescindibile, dalla coltivazione del ceppo, ma, possono essere adoperati direttamente su campioni clinici di pazienti, ospiti serbatoio o flebotomi (WHO, Technical Report Series 949, 2010). Non di meno, per quanto versatili e molto utilizzate, la standardizzazione rimane ancora una priorità (WHO, Technical Report Series 949, 2010).

Le analisi molecolari hanno convalidato la suddivisione nei due sottogeneri stabiliti da Lainson e Shaw, (1987) e la concordanza ha confermato i criteri di identificazione estrinseci ed intrinseci.

Anche se non tutti gli studi presenti in letteratura concordano, le metodiche molecolari hanno fatto luce sulla relazione filogenetica tra *Leishmania infantum* e *L. chagasi*.

In modo del tutto speculativo, è possibile supporre che la loro origine comune potrebbe anche avere dei risvolti nel fatto che i canidi, specialmente cani domestici o randagi sono gli ospiti *reservoir* (vedi paragrafi successivi) di *L. infantum* e *L. chagasi*, mentre il solo ospite *reservoir* conosciuto di *L. donovani* è l'uomo. E' tuttavia da precisare che la trasmissione delle malattie e le leishmaniosi dipendono da un numero elevato di fattori (alcuni dei quali possibilmente influenzati da fenomeni coevolutivi) tra cui, la specie di leishmania, la specie di vettore, la specie ospite con le proprie caratteristiche genetiche ed immunologiche.

## 1.2 - Caratteristiche genomiche

Negli ultimi anni è stato avviato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità Programma Speciale per la Ricerca e Formazione sulle Malattie Tropicali (WHO/TDR) il progetto genoma Tritryp, volto a sequenziare il genoma dei tre *Kinetoplastidi*: *Leishmania*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*.

---

<sup>2</sup> I microsatelliti sono ripetizioni di corte sequenze di nucleotidi (da 1 a 5), sparse più o meno casualmente per tutta la lunghezza del genoma.

Il progetto, ha portato alla conoscenza della sequenza dell'intero genoma delle specie rappresentative *Leishmania major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*. Questo primo passo può essere utile a comprendere qual'è il contributo del genoma del parassita al “fenotipo” della malattia (Smith *et al.*, 2007). In **Tabella 2** è mostrato il confronto di alcuni parametri di analisi del genoma di tre specie di *Leishmania* e del *Trypanosoma brucei*. In particolare, si può notare che *L. major* e *L. infantum*, in comune con altre specie del Vecchio Mondo, hanno un contenuto aploide di 36 cromosomi, mentre le specie del Nuovo Mondo ne hanno 35 (*L. braziliensis*) o 34 (*L. mexicana*) (Smith *et al.*, 2007).

Metodi innovativi come la genomica (studio del genoma), la proteomica (studio delle proteine), la trascrittomica (studio degli mRNA), lo studio dei microRNA<sup>3</sup>, possono dare un contributo nel definire il ruolo di alcuni fattori, delle diverse specie di *Leishmania*, nell'evoluzione della malattia.

In ultimo, deve essere tenuto in conto che durante tutto il ciclo biologico il protozoo della *Leishmania*, per sopravvivere ad ambienti spesso estremi, deve differenziare la sua morfologia, la motilità, la sua capacità di dividersi e d'infettare. E' possibile dire che questo parassita presenta una grande plasticità e complessità che può rendere molto difficoltosa, seppur sorprendente ed affascinante, l'analisi e lo studio di singoli fattori sia essi genetici che proteici all'interno della comprensione delle forme di malattia.

Di immediata applicazione pratica, da questi studi, è trarre informazioni su:

- potenziali candidati per vaccini e richiedere una robusta valutazione, per identificare le molecole più favorevoli da includere negli studi clinici (Kedzierski *et al.*, 2006);
- identificazione di validi bersagli farmacologici tramite la conoscenza delle vie metaboliche *Leishmania*-specifiche rivelate, da analisi comparative;
- nuovi reagenti diagnostici, più sensibili e specifici, che possono emergere dall'esplorazione delle diverse sequenze del genoma.

---

<sup>3</sup> I microRNA sono piccole molecole di RNA, a singolo filamento di 20-22 nucleotidi che svolgono diverse funzioni, la più nota attualmente è una regolazione post-trascrizionale. Essi si dividono in tre classi: *Short interfering RNA* (siRNA), *MicroRNA* (miRNA), *Piwi RNA* (piRNA).

	<i>Leishmania major</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
Total size (Mb)	32.8	32.1	32.0	26.1
Contigs	36	562	1,041	30
No. of chromosomes	36	36	35	11*
Chromosome size range (Mb)	0.3–2.8	0.3–2.8	0.3–2.8	1–5.2
Overall G+C content %	59.7	59.3	60.4	46.4
No. of genes	8,298	8,154	8,153	9,068
No. of pseudogenes	97	41	161	904
Average gene size (bp)	1,894	1,868	1,873	1,592
Gene density (per Mb)	252	235	258	317
Coding percentage	48.0	44.0	48.5	50.5
Coding G+C content %	62.5	62.4	60.4	50.9
No. of DGCs	133	133	n/a	127
Average DGC length (kb/genes)	240/61	n/a	n/a	204/71
No. of tRNAs	83	62	66	65
No. of snoRNAs	693	n/a	n/a	353
No. of snRNAs	6	n/a	n/a	5
No. of rRNAs	63	n/a	n/a	56
Average intergenic size	1,939	2,049	1,976	1,279
Active mobile elements	None (degenerate RIME/DIRE)	None (degenerate RIME/DIRE)	TATEs, SLACS	ingi, RIME, DIRE, SLACs, SIRE, VIPER

Smith *et al.* 2007. Int J Parasitol.

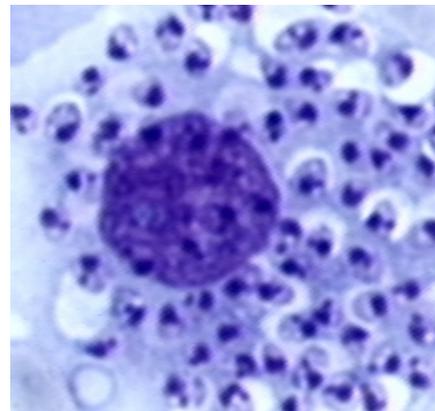
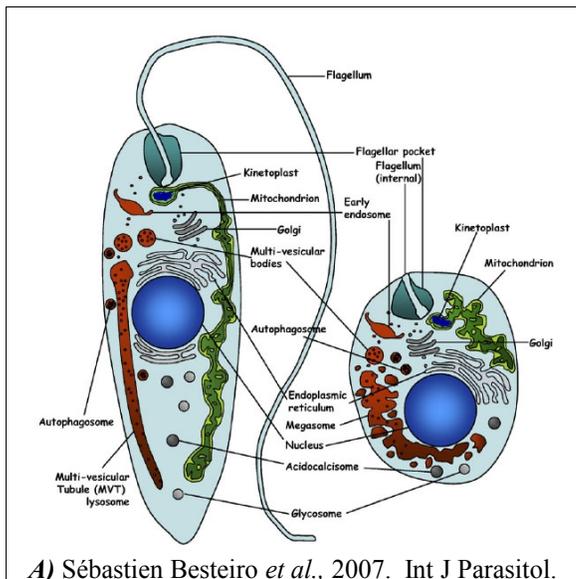
**Tabella2:** Confronto di alcuni parametri di analisi del genoma di tre specie di *Leishmania* e del *Trypanosoma brucei*.

### 1.3 - Morfologia

La *Leishmania* è un microrganismo dimorfico: nei mammiferi infestati si presenta sotto forma di amastigote (**Figura 2 A e B**), con corpicciolo rotondeggiante, immobile, di 2-5  $\mu\text{m}$  di lunghezza per 2-3  $\mu\text{m}$  di larghezza.

E' fornito di protoplasma granuloso, omogeneo, delimitato alla periferia da un plasmalemma tristratificato. E' manifesto un grosso nucleo sferico centrale o eccentrico e un cinetoplasto (kinetoplasto, DNA extranucleare, mitocondriale) piriforme od a bastoncino, situato alla periferia del corpo parassitario, molto spesso in posizione antinucleare, perpendicolare al nucleo. E' presente un abbozzo di flagello, il rizoplasto, costituito da nove paia di microtubuli periferici e da due assiali, che si diparte in prossimità del cinetoplasto da un corpo basale (blefaroblasto) e si esaurisce, senza esterriorizzarsi, alla periferia della cellula protozoaria. Il blefaroblasto è circoscritto da un manicotto citoplasmatico rivestito dal plasmalemma che qui si invagina profondamente in modo da formare attorno al rizoplasto stesso, una tasca flagellare aperta verso l'esterno.

L'amastigote si insinua all'interno delle cellule macrofagiche del mammifero ospite, più precisamente all'interno di un vacuolo, intracitoplasmatico, circoscritto dalla membrana fagosomiale che, fondendosi a sua volta con i lisosomi, forma il fagolisosoma; qui si sviluppa e si moltiplica per scissione binaria dando origine a numerosi elementi simili. Negli insetti vettori, i flebotomi, la *Leishmania* si sviluppa, si differenzia e moltiplica dando origine alla forma flagellate chiamata, promastigote, (**Figura 2 A e C**).



**Figura 2:** **A)** Rappresentazione schematica della *Leishmania spp.* con l'evidenza della forma e del proprio contenuto interno. A sinistra è rappresentata la forma promastigote, a destra la forma amastigote. **B)** Immagine fotografica della forma amastigote in un esame citologico. **C)** Immagine fotografica della forma promastigote.

La morfologia è differente rispetto alla forma amastigote in quanto essa presentava un corpo stretto e lungo fino a 20  $\mu\text{m}$ , mobile per la presenza di un robusto e lungo flagello, che nasce dal blefaroblasto e fuoriesce dalla tasca flagellare con una porzione lunga pressoché quanto l'intero corpo. Questo è uno stadio tipicamente extracellulare.

#### 1.4 - Ciclo biologico

La *Leishmania spp.* è un protozoo dixeno, cioè, ha un ciclo biologico che si completa tra 2 ospiti: un ospite intermedio invertebrato, costituito dal vettore flebotomo, ed un ospite definitivo, rappresentato dal mammifero vertebrato, che può svolgere il ruolo di serbatoio della malattia.

Il ciclo nel vettore inizia quando la femmina ematofaga compie un pasto di sangue da un mammifero infetto, ingerendo le leishmanie presenti in forma amastigote (**Figura 3**). Nell'intestino medio dell'insetto questi protozoi producono il flagello ed assumono la forma promastigote. In tale sede, inoltre, inizia una fase di attiva moltiplicazione per scissione binaria, alla temperatura di circa 25°C, successivamente si ha la migrazione verso le ghiandole salivari. A livello della faringe i parassiti raggiungono lo stadio della maturazione trasformandosi in promastigoti infettanti o metaciclici, altamente mobili, con corpo di dimensioni ridotte, ed in ultimo migrano verso la proboscide, pronti per essere inoculati (Sacks e Perkins, 1984).

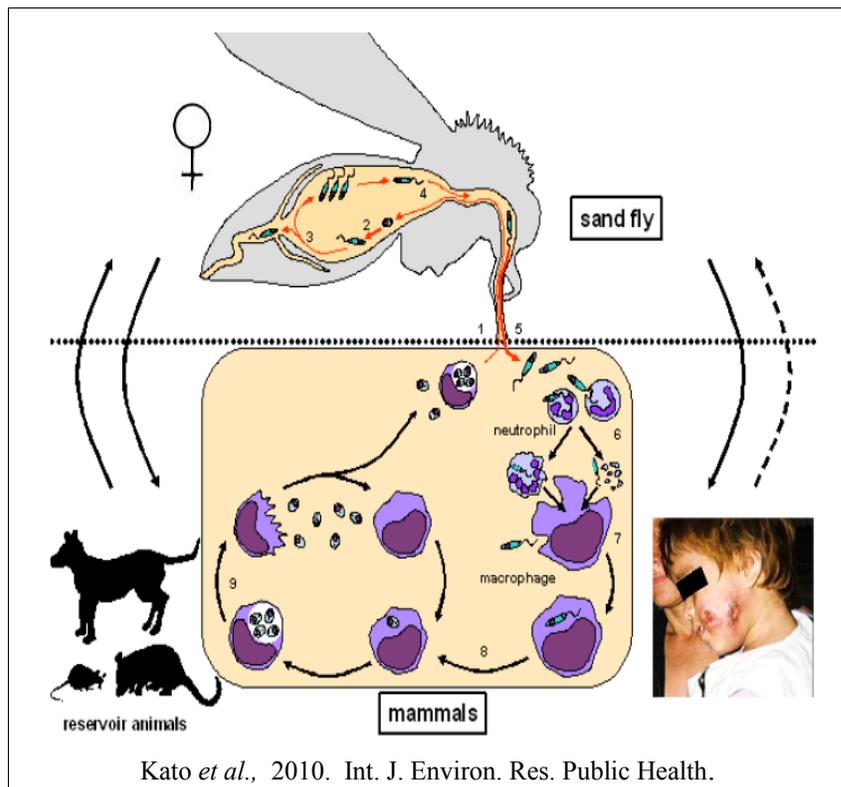
Così, nell'arco di questo intervallo di tempo, che varia da un minimo di 4 giorni ad un massimo di 20, in funzione della specie di *Leishmania*, dell'insetto ematofago e soprattutto della temperatura ambientale (il ciclo infatti è completamente inibito sotto i 10° C.), i promastigoti, danno origine alla forma capace di conferire infezione all'ospite vertebrato (mammifero).

I promastigoti vengono trasmessi attraverso la puntura dell'insetto che li inocula, durante il pasto di sangue, nel nuovo ospite vertebrato, a livello della cute. Questo sito, dunque, rappresenta il sito primario di infezione del mammifero.

Una volta introdotti, i promastigoti, entrano nel circolo sanguigno, dove vengono subito ricoperti da proteine del complemento, le quali, richiamano i macrofagi che li catturano e fagocitano. Tale meccanismo rappresenta la prima via di difesa del sistema immunitario.

All'interno dei macrofagi il promastigote perde il flagello ritornando alla forma amastigote. Nel macrofago si ha la fusione del fagosoma con il lisosoma e si forma il fagolisosoma; all'interno di esso la leishmania viene esposta a fattori che tentano di distruggerla, ciò però non sortisce nessun effetto perché la parete dell'amastigote contiene glicoproteine resistenti agli enzimi e ai metaboliti del macrofago.

In questa sede il protozoo si moltiplica per scissione binaria fin quando, il macrofago, pieno di parassiti, si rompe per lisi della cellula che lo ha fagocitato. Gli amastigoti vengono così liberati e possono invadere altre cellule del sistema reticolo-endoteliale. Questo meccanismo permette la diffusione dell'infezione dal luogo della puntura o verso le mucose o verso organi ricchi di macrofagi quali: fegato, milza e midollo osseo.



**Figura 3:** Rappresentazione schematica del ciclo biologico della *Leishmania spp.* **1.** Il vettore ingerisce gli amastigoti durante il pasto di sangue. **2.** Gli amastigoti si trasformano in promastigoti. **3.** I promastigoti colonizzano e si moltiplicano nell'intestino caudale e medio del flebotomo. **4.** I promastigoti infettivi (metaciclici) migrano verso la parte anteriore dell'intestino. **5.** Lo stadio infettivo dei promastigoti è trasmesso ad un ospite mammifero dalla punture del flebotomo. **6.** I promastigoti invadono i neutrofili dell'ospite. **7.** I macrofagi sono infettati dai promastigoti direttamente o tramite la fagocitosi dei neutrofili infetti, o da promastigoti silenziosamente rilasciati dai neutrofili infetti apoptotici. **8.** I promastigoti si trasformano in amastigoti. **9.** Gli amastigoti si moltiplicano nelle cellule infettate per fissione binaria. La freccia tratteggiata rappresenta la trasmissione antroponotica, la freccia continua rappresenta la trasmissione animale-animale o animale-uomo(zoonotica).

La maggior parte delle specie di *Leishmania* sono mantenute da un ciclo di trasmissione animale-animale, considerati ospiti serbatoio, mentre gli esseri umani sono considerati ospiti accidentali ed in questo caso le leishmaniosi sono malattie zoonotiche. Comunque è segnalata, in alcune specie di *Leishmania spp.*, anche la trasmissione antroponotica, senza serbatoi animali(Desjeux, 2001).

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

L'adesione del protozoo è mediata dal lipofosfoglicano (GPL), il maggior glicoconiugato di superficie dei promastigoti. Tali strutture sono polimorfiche tra le specie della leishmania, suggerendo che il GPL è il maggiore fattore determinante nello stabilire la specie vettore (Sacks *et al.*, 2000).

Ad ogni modo, studi riportati in letteratura indicano che anche molecole dell'intestino medio del flebotomo sono fattori determinanti della competenza vettoriale. (Kamhawi *et al.*, 2004)

## 2 - Il vettore

La biologia di ogni specie di flebotomo è unica e complessa, essa copre tutti gli aspetti della riproduzione, alimentazione, dispersione e altre attività ed è di rilevante importanza per l'epidemiologia delle malattie da loro trasmesse e per il controllo dei vettori (WHO, 1990).

La maggior parte delle specie non svolge alcun ruolo nella la trasmissione della leishmaniosi in natura, questo per diverse ragioni tra cui il fatto che non effettuano il pasto di sangue dall'uomo e da animali ed, inoltre, non sono in grado di sostenere lo sviluppo della *Leishmania spp* ( Killick-Kendrick R., 1999).

Meno del 10% dei flebotomi, infatti, sono stati implicati essere specie portatrici di leishmaniosi, e solo per circa 30 specie è stata dimostrata la capacità vettoriale. Ogni specie di flebotomo non può che sostenere lo sviluppo e di conseguenza trasmissione di una determinata specie di *Leishmania* ( Bates, 2007; Sacks, 2001).

Circa 80 sono, invece, le specie provate o sospettate di essere i vettori delle 22 specie di *Leishmania* che causano malattia nell'uomo. In alcuni focolai di Leishmaniosi i vettori rimangono sconosciuti.

I criteri generali accettati affinché si possa definire un vettore di *Leishmania spp.* sono: il vettore deve essere antropofilo, deve pungere l'animale reservoir, la sua distribuzione deve coincide con quella della malattia trasmessa, deve essere infettato in natura con la stessa *Leishmania* che si ritrova nell'uomo o nell'animale, deve sostenere la crescita rigogliosa del parassita che trasmette ed infine deve essere capace di trasmettere il parassita attraverso la puntura ( WHO Technical Report Series 949, 2010).

### 2.1 - Classificazione

I responsabili della diffusione della leishmaniosi sono i vettori(flebotomi), classificati nel **Phylum:** *Arthropoda*; **Subphylum:** *Tracheata (Antennata)*; **Classe:** *Insectea*; **Subclasse:** *Pterygota* (insetti volanti con metamorfosi completa); **Ordine:** *Diptera* (insetti a due ali); **Sottordine:** *Nematocera*; **Famiglia:** *Phlebotomidae/Psychodidae*; **Subfamiglia:** *Phlebotominae* (Kalra NL e Bang YH., 1988).

Ad oggi circa 800 specie di flebotomi sono stati registrati in 5 generi principali: *Phlebotomus* (94 specie) e *Sergentomyia* (258 specie) nel Vecchio Mondo, e *Lutzomyia* (379 specie), *Brumptomyia* (23 specie) e *Warileya* (5 specie) nel Nuovo Mondo (WHO Technical Report Series 949, 2010). Sebbene flebotomi che pungono l'uomo si possono

ritrovare in altri generi, i vettori per cui si è dimostrata la trasmissione del protozoo parassita *Leishmania spp.* all'uomo sono le specie e sottospecie che appartengono al genere *Phlebotomus*, nel Vecchio Mondo e *Lutzomyia*, nel centro e sud America (WHO Technical Report Series 949, 2010). Questi ultimi due generi dal punto di vista morfologico si somigliano molto strettamente (Munstermann *et al.*, 2004). Il genere *Phlebotomus* è a sua volta diviso nei **sottogeneri**: *Phlebotomus*, *Paraphlebotomus*, *Synphlebotomus*, *Larrousius*, *Transphlebotomus*, *Adlerius*, *Euphlebotomus*, *Kasaulius*, *Anaphlebotomus*.

Gli studi tassonomici sono basati principalmente sulle caratteristiche morfologiche, in genere, valutate sugli adulti sulla base delle strutture interne come il cibarium, la spermateca, la faringe nelle femmine, i genitali nei maschi. Altre caratteristiche includono la localizzazione e l'intensità della pigmentazione del torace, i rapporti di lunghezza della nervatura alare, e dei segmenti antennali (Young *et al.*, 1994).

Molti, ma non tutti, i maschi possono essere identificati dalla sola morfologia; spesso è più difficile identificare le femmine, alcune delle quali sono implicate come vettori (WHO Technical Report Series 949, 2010).

Le più recenti e complete sono quelle di Galati, in cui, le 464 specie di flebotomi Neotropicali sono classificate in 22 generi, 20 sottogeneri, 3 gruppi di specie e 28 serie (WHO Technical Report Series 949, 2010). Per quanto sono stati fatti progressi importanti, sono previsti ulteriori cambiamenti in quanto non tutto è pienamente accettato.

Ad oggi, circa 90 caratteristiche sono state dimostrate utili come descrittori efficaci, e queste sono esaminate e misurate su ciascun campione con un microscopio dopo un'opportuno montaggio (Young *et al.*, 1994; Munstermann *et al.*, 2004).

E' quindi comprensibile come la classificazione morfologica richieda una notevole abilità nella perizia tassonomica. Inoltre, la presenza di variazione intraspecifica e di specie criptiche complica frequentemente classificazioni basate sulle caratteristiche morfologiche (Bauzer *et al.*, 2007).

In passato, la gas-cromatografia di idrocarburi cuticolari e l'elettroforesi degli isoenzimi sono state tecniche utili per identificare femmine di specie affini, morfologicamente indistinguibili. Negli ultimi anni, però, queste tecniche sono state sostituite dalle analisi del DNA, che permettono la misurazione di differenze genetiche tra popolazioni di specie strettamente correlate e di rivelarne le relazioni evolutive. Questi nuovi metodi,

ad oggi, non risolvono tutti i problemi di tassonomia (WHO Technical Report Series 949, 2010).

Dal momento che la diffusione di leishmaniosi dipende in gran parte dalla distribuzione dei vettori, l'individuazione e la caratterizzazione delle varie specie in aree endemiche e limitrofe è importante per una puntuale valutazione sui fattori di rischio per l'espansione della leishmaniosi.

Inoltre, studi tradizionali ed innovativi, possono dare chiarimenti sull'interazione ed il rapporto tra la *Leishmania spp.* e le specie vettore oltre che sulla ricerca epidemiologica (Kato H. *et al.*, 2008).

## 2.2 - Morfologia

Sono minuscoli insetti con aspetto simile ad un moscerino ed una lunghezza corporea di circa 2-3 mm (**Figura 4 A e B**). Il corpo, coperto da lunghi e fitti peli, mostra un colore che varia dal quasi bianco al quasi nero secondo le specie, ma generalmente giallo-paglierino o giallo-ruggine in quelle mediterranee; la testa è allungata e inserita sul collo in modo da formare un angolo di 45°; gli occhi sono composti, voluminosi, di colore scuro, situati ai lati della testa (appaiono rotondeggianti se visti di profilo e reniformi se visti dorsalmente). L'apparato boccale delle femmine, pungente e succhiatore, è formato da: labrum-epifaringe (scanalato centralmente e denticolato alla sua estremità), due mandibole seghettate, due mascelle a forma di lama (mascella e mandibola sono predisposte ad incidere la cute), ipofaringe (che porta il dotto salivare), il tutto contenuto, in condizioni di riposo, dentro il labbro inferiore o labium. Ai lati delle mascelle sono presenti i palpi mascellari, pelosi e ricurvi, composti da 5 articoli con il terzo recante le spine di Newstead, organi sensitivi con struttura caratteristica.

La proboscide è corta e diretta verso il basso. Le antenne sono lunghe, pelose, costituite da 16 segmenti o articoli (alcuni di questi fungerebbero da organi di senso).

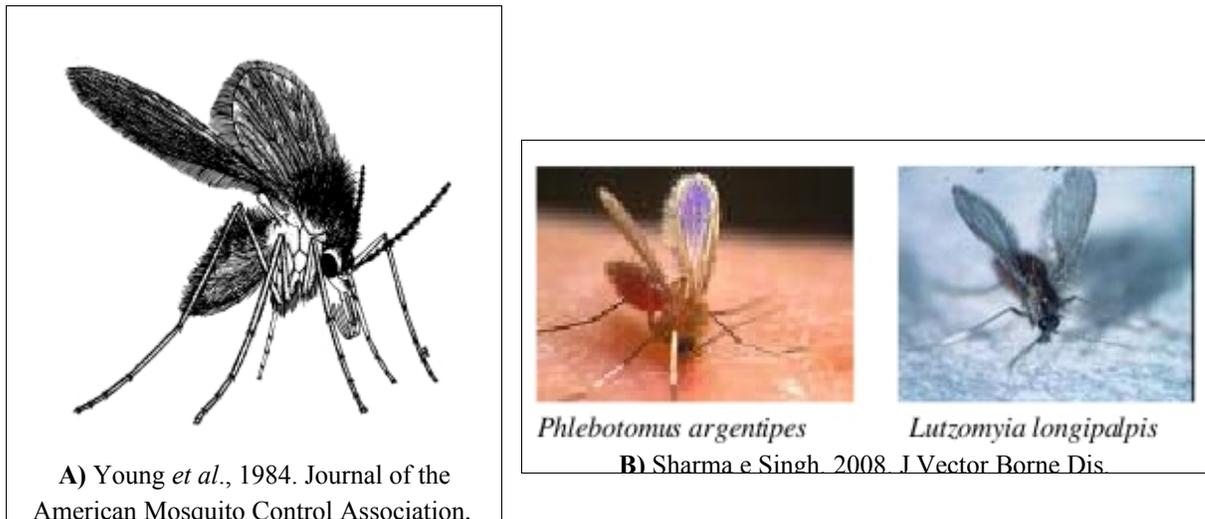
Il torace e l'addome formano un angolo quasi retto, rendendoli riconoscibili anche ad occhio nudo. Il torace è composto da tre segmenti.

Nel mesotorace, molto sviluppato, sono presenti un paio di ali; queste sono lunghe, abbondantemente nervate e pelose, di forma lanceolata. Nel metatorace sono invece presenti due bilancieri.

L'addome è composto da 10 segmenti, di cui i terminali (3 nella femmina e 4 nel maschio) sono trasformati nell'apparato genitale. Nella femmina il nono, urite, si

differenza in una furca che circonda l'apertura genitale ed il decimo segmento è ridotto a due cerci fra i quali sbocca l'apertura anale.

Nel maschio il settimo e ottavo urite sono invaginati l'uno nell'altro mentre il nono e il decimo segmento sono completamente modificati e costituiscono l'armatura genitale (Young *et al.*, 1994).



**Figura 4:** A) Rappresentazione schematica dell'aspetto morfologico del vettore; B) Immagine fotografica delle due specie *Phlebotomus argentipes* (è il vettore dimostrato di kala-azar in India (Swaminath *et al.*, 1942)) e *Lutzomyia longipalpis*.

### 2.3 - “Infezione” o presenza nel flebotomo

Il protozoo parassita è trasmesso al vettore ematofago attraverso il pasto di sangue che le femmine, pappatacee, effettuano per procurarsi le sostanze necessarie per la maturazione delle uova.

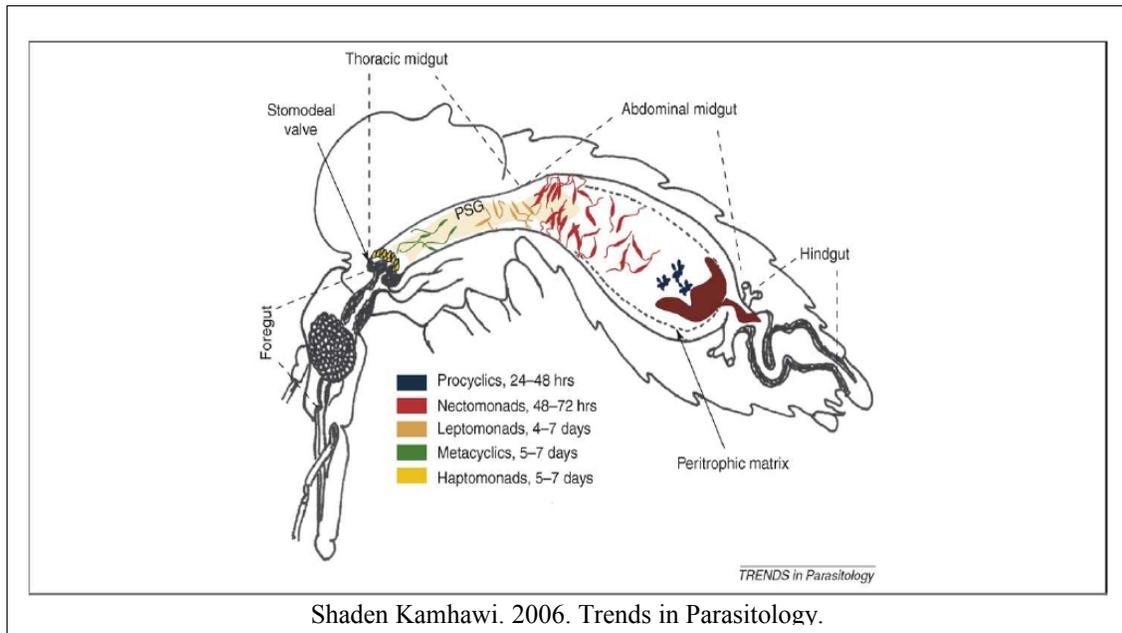
La suscettibilità o la refrattarietà alla *Leishmania* dipende dal risultato delle multiple interazioni che si svolgono all'interno del tubo digerente del vettore (Shaden Kamhawi, 2006).

L'ingestione del sangue del mammifero che contiene i macrofagi infettati con il protozoo della *Leishmania spp.*, nella forma amastigote, dà inizio all'infezione nell'insetto vettore. Il pasto di sangue infetto passa all'intestino medio posteriore, per essere digerito. I parassiti di *Leishmania*, mentre migrano anteriormente dall'intestino medio posteriore alla valvola stomodale<sup>4</sup>, si differenziano in diverse forme, attraverso distinte fasi di sviluppo. Ognuna di queste fasi è caratterizzata da cambiamenti morfologici, metabolici

<sup>4</sup> La valvola stomodale forma una giunzione con l'intestino anteriore che include la faringe, il cibarium e la proboscide.

e funzionali finalizzati ad assicurare la sopravvivenza del protozoo nel vettore (Shaden Kamhawi, 2006).

Come mostrato in **Figura 5**, in un primo momento, entro le 24-48 ore dall'ingresso, gli amastigoti si differenziano in piccoli, lenti promastigoti prociclici con corti flagelli ed inizia il primo ciclo di moltiplicazione nel vettore.



Shaden Kamhawi. 2006. Trends in Parasitology.

**Figura 5:** Illustrazione, tempo-dipendente, di distinte forme del protozoo della *Leishmania* nell'intestino medio del vettore competente. Questo schema è relativo al sottogenere *Leishmania* in cui lo sviluppo è limitato all'intestino medio e non al sottogenere *Viannia*, come *Leishmania braziliensis*, dove il parassita entra nell'intestino posteriore prima di migrare in avanti verso l'intestino medio.

Queste forme sono separate dall'intestino medio da una matrice peritrofica di tipo I (PM). La matrice peritrofica possiede caratteristiche chimiche proprie per ciascuna specie di flebotomo, ciò può contribuire a spiegare la specificità tra il tipo di flebotomo e la specie di *Leishmania* trasmessa. Le forme, sopra menzionate, sono relativamente resistenti all'azione litica degli enzimi digestivi del vettore. Tale proprietà è resa possibile grazie a specifiche molecole di superficie della *Leishmania* (gp63, LPG) (Davies *et al.*, 1990).

Le forme procicliche, successivamente, si sviluppano in nectomonadi, forme sganciate, di grandi dimensioni, la cui funzione è quella di: sfuggire al confinamento della PM (attraverso la sintesi di enzimi chitinolitici utili per liberarsi dalla membrana peritrofica), ancorarsi alle cellule epiteliali che rivestono l'intestino medio (grazie ai residui di zuccheri, di  $\beta$ -galattosio, delle molecole di LPG, presenti ai livelli del flagello, che si

legano alla lectina del tubo digerente) e migrare in avanti verso la parte anteriore (toracica) (Shaden Kamhawi, 2006).

Le forme leptomonadi, di nuova individuazione (Gossage *et al.*, 2003; Bates *et al.*, 2004), derivano dalle nectomonadi e vanno incontro al secondo ciclo di moltiplicazione nel vettore.

Infine, si osservano due stadi nella valvola stomodale, le forme aptomonadi e quelle metacicliche. Le aptomonadi, la cui forma precursore è ancora oggetto di discussione, sono altamente specializzate, simili a foglie con flagelli brevi, non mobili e formano un tappo sulla valvola stomodale. Le forme metacicliche si trovano dietro la valvola stomodeale e rappresentano la fase infettiva, in quanto sono altamente adattate per la trasmissione ai mammiferi (Shaden Kamhawi, 2006). Queste, infatti, sono le forme inoculate dall'insetto vettore nell'ospite vertebrato, e sono responsabili dell'inizio dell'infezione in quest'ultimo. Morfologicamente, i promastigoti metaciclici, hanno un corpo piccolo con un flagello di forma allungata e sono molto mobili. Mostrano una certa resistenza alla lisi mediata dal complemento attuata, come difesa immunitaria, dall'ospite vertebrato (Shaden Kamhawi, 2006).

Il tempo necessario, per i parassiti, per completare il loro sviluppo nel vettore è di 6-9 giorni, a seconda della specie (Shaden Kamhawi, 2006). Una volta nell'intestino medio posteriore, il pasto di sangue infetto è completamente contenuto nel PM entro 4 ore. Gli amastigoti rilasciati si trasformano in prociclici, e subiscono una rapida moltiplicazione per le successive 24-48 ore. La trasformazione di queste forme in nectomonadi mobili avviene durante il secondo o terzo giorno. A questo punto la degenerazione della PM consente la fuoriuscita di nectomonadi nel lume intestinale dove si attaccano lungo l'epitelio dell'intestino medio e migrano in avanti a colonizzare l'intestino medio anteriore. Le nectomonadi potranno dar luogo alle leptomonadi dal 4° giorno le quali, moltiplicandosi attivamente, portano ad una massiva infezione a livello dell'intestino medio anteriore. La fase finale, dal 5° al 7° giorno, è rappresentata dai pomastigoti metaciclici (Shaden Kamhawi, 2006).

## 2.4 - Il ciclo vitale

I flebotomi sono insetti olometaboli, cioè a metamorfosi completa. Il ciclo vitale comprende due diversi stadi biologici: l'adulto volante e le fasi di sviluppo, che includono le uova, quattro stadi larvali e quello pupale sessile.

Lo sviluppo degli stadi immaturi del flebotomo si svolge in un terreno umido, ricco di materiale organico. I siti di riproduzione possono essere ubicati nelle cavità degli alberi, nelle crepe del suolo e nella lettiera forestale. Comunque, per la maggior parte delle specie di flebotomi, la localizzazione dei siti di riproduzione è sconosciuta (Dedet, 2010).

I flebotomi sono presenti da maggio ad ottobre nella regione paleartica<sup>5</sup> e la durata del loro ciclo di sviluppo è strettamente legata ai fattori climatici.

In Italia, durante la stagione calda, da Giugno a Settembre, è stato osservato che possono verificarsi almeno due cicli di sviluppo completo, corrispondenti quindi a due generazioni di adulti (Maroli e Bettini, 1977).

La riproduzione e la maturazione delle uova, nella maggior parte delle specie, avviene solo dopo un pasto di sangue da parte delle femmine ematofaghe. Il pasto di sangue avviene grazie alle strutture buccali atte a perforare la pelle dei propri ospiti. Le varie specie differiscono per il numero di pasti di sangue consumati durante ciascun ciclo gonotrofico<sup>6</sup>: alcune specie si nutrono di sangue più di una volta in differenti giorni, mentre altre lo fanno solo una volta per ovodeposizione.

Lo studio di quest'aspetto è importante perché frequenti pasti di sangue incrementano i contatti tra i vettori ed i vertebrati e di conseguenza possono influenzare l'efficienza della trasmissione della *Leishmania*.

Il tempo che intercorre tra il pasto di sangue e la deposizione delle uova varia a seconda delle specie e della temperatura ambientale (Killick-Kendrick R., 1999).

La femmina depone le sue uova, in vari siti: in tane di certi roditori, nella corteccia di alberi secolari, in edifici in rovina, nelle fessure dei muri di casa, in ricoveri di animali e rifiuti domestici, o in ambienti in cui queste larve possono trovare la materia organica, il calore e l'umidità che sono necessari per il loro sviluppo (Sharma e Singh, 2008).

Ad ogni ovodeposizione (mediata da ferormoni) possono essere rilasciate, in buchi del terreno, nei pavimenti o su vegetali in decomposizione, più di 50-100 uova; queste per svilupparsi hanno bisogno di elevata umidità ed in condizioni favorevoli possono

---

<sup>5</sup> Europa, Asia a nord dell'Himalaya, Africa settentrionale e la zona nord e centrale della penisola arabica.

<sup>6</sup> Il tempo che separa il/i pasto di sangue e la deposizione della uova.

schiodere in 1-2 settimane (Killick-Kendrick R. *et al.*, 1999). Si libera la larva di primo stadio e si succedono quattro tappe di sviluppo larvale attraverso processi di muta consecutivi, poi si raggiunge la fase di pupa all'interno della quale si forma l'insetto adulto.

Il loro sviluppo dura da 3 settimane ad alcuni mesi a seconda della specie, della temperatura e della disponibilità di cibo (Killick-Kendrick R. *et al.*, 1999). Le caratteristiche delle uova rivestono interesse tassonomico. I flebotomi adulti vivono in media quattro settimane e compiono il ciclo gonotrofico tre o quattro volte.

La comprensione e la conoscenza del ciclo vitale e dei siti di riproduzione delle varie specie è un utile strumento nello studio delle dinamiche epidemiologiche e delle possibili misure di prevenzione e controllo.

## 2.5 - Attività ed abitudini

In generale, le specie di flebotomi del Vecchio Mondo vivono in ecosistemi semi-aridi o desertici, le specie del Nuovo Mondo vivono nel habitat della foresta.

Entrambi i sessi sono glicifagi, si nutrono cioè di succhi zuccherini vegetali, mentre solo le femmine sono ematofaghe.

Il pasto di sangue delle femmine ematofaghe, si compie, più attivamente, nelle ore crepuscolari (con un picco appena dopo il tramonto, probabilmente condizionate dall'abbassamento della temperatura e dall'aumento dell'umidità) e notturne, mentre, nel corso della giornata, le femmine rimangono a riposo in zone ombreggiate. Variazioni meteorologiche come l'aumento della nuvolosità possono incrementare l'attività del flebotomo. Al contrario, l'aumento della velocità del vento riduce la capacità di volo dell'insetto.

Il grado di antropofilia o zoofilia è essenziale per determinare il ciclo di trasmissione (WHO, 1990). Risulta, ad esempio, che *P. ariasi* si alimenta su canidi, uomo, bovidi, leporidi, equidi e roditori (Guy *et al.*, 1984); al contrario *P. papatasi* si è dimostrato altamente antropofilo (El Sawaf *et al.*, 1994); ed infine *P. perniciosus*, in base alla abbondanza relativa degli ospiti vertebrati, tende a selezionare con intensità maggiore il cane rispetto al cavallo ed all'uomo e meno ancora le altre specie; del tutto simile è risultato il comportamento di *P. perfiliewi* (Bongiorno *et al.*, 2003).

Il periodo di attività è compreso tra fine Maggio, inizio di Giugno, fino a metà Ottobre, in presenza di temperature superiori ai 18 C°, ed in assenza di vento. Nelle regioni

tropicali invece l'attività è registrata durante tutto l'anno (Killick-Kendrick R. *et al.*, 1999).

L'habitat preferito dai flebotomi è quello secco, con vegetazione a macchia mediterranea, ricco di anfratti (zone tufacee), ad un'altitudine di 100-300 m s.l.m., anche se i flebotomi possono adattarsi anche ad altitudini di poco superiori ai 1000 m. Biocca *et al.*, (1977) riportano di aver catturato *P. ariasi* e *P. perniciosus* a 1060 m in provincia di Imperia, nonché, il solo *P. perniciosus* a 805 m a Vinadio in Piemonte, a 900 m negli Abruzzi, a 880 m in Sicilia e a 800 m in Sardegna.

Le aree del cane punte con maggior frequenza sono: testa, dorso del naso, padiglioni auricolari, addome, superficie interna e parte distale degli arti. Come spiegato nel paragrafo patogenesi, la puntura provoca reazioni allergiche più o meno gravi causate dalla deposizione di saliva, che contiene sostanze farmacologicamente attive come anticoagulanti e vasodilatatori che aiutano la suzione prima del pasto di sangue.

## 2.6 - Distribuzione in aree endemiche

I flebotomi si trovano in tutte le parti del mondo, ma abbondano soprattutto nelle zone calde e torride.

In Italia, numerosi autori hanno condotto ricerche sui flebotomi come vettori della leishmaniosi e sulla loro distribuzione nel territorio.

Il territorio Nazionale è caratterizzato dalla presenza di otto specie di flebotomi, che appartengono a due generi, *Phlebotomus* e *Sergentomyia*, ed includono: *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, *Phlebotomus perfiliewi* Parrot, 1930, *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921, *Phlebotomus papatasi* Scopoli, 1786, *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 e *Sergentomyia minuta* Rondani, 1843 ( Maroli *et al.*, 1994, 1998; D'Urso *et al.*, 2004).

Un monitoraggio costante della presenza dei vettori nei nuovi focolai di leishmaniosi è fondamentale per valutare l'espansione geografica della malattia (Viviana D. Tarallo *et al.*, 2010).

Per un quadro generale sulla loro diffusione e densità bisogna fare riferimento al lavoro condotto da Biocca *et al.* (1977), da cui è emerso che, su 42.242 flebotomi raccolti, le specie più diffuse risultavano *S. minuta* (20.184), *P. perniciosus* (12.940) e *P. perfiliewi* (8.480).

*P. perniciosus* era presente nella maggior parte delle regioni italiane con una densità più alta nella costa tirrenica e ionica ed anche in Sicilia e Sardegna e *P. perfiliewi* aveva

anch'esso un'ampia distribuzione, ma sul versante adriatico degli Appennini, dall'Emilia-Romagna fino agli Abruzzi. Altri focolai importanti di questa specie si trovano in Toscana, Calabria e Sicilia. E altresì presente in Sardegna.

*P. neglectus*, In passato sembrava essere presente limitatamente ad alcune regioni del sud Italia (Puglia, Calabria e Sicilia) ma recentemente è stato rinvenuto anche nel nord-est dell'Italia (provincia di Verona) (Maroli *et al.*, 1994, 1995, 2002) ed in Piemonte a Chiaverano, presso Ivrea (Capelli *et al.*, 2004). Risultati precedenti sono in linea con le relazioni di *P. neglectus* in Italia (Maroli *et al.*, 2008), dove questa specie è stata trovata al livello del mare, lungo le foci costiere di regioni meridionali italiane, e nelle zone collinari fino a 1300m sopra livello del mare (Maroli *et al.*, 2002) e con le relazioni svolte nel 2008-09 nel sud Italia (Viviana D. Tarallo *et al.*, 2010).

Il gruppo di Maroli ha valutato la dinamica stagionale di *P. perniciosus* in Sicilia ed è stata rilevata la presenza di questo flebotomo per sei mesi, da Maggio a Novembre. Gli stessi Autori riportano, per la Toscana (valutazione risalente al 1974) un periodo di attività più breve, per questa specie, da va Giugno ad Ottobre. Studi di Viviana D. Tarallo *et al.*, 2010 mostrano che nel 2008 e 2009, la maggior parte dei flebotomi sono stati raccolti in Luglio e Agosto, quando la temperatura media mensile è più alta (cioè, 27,09-28,02°C) e vi è la più bassa umidità relativa media mensile (47,28% fino al 56,36%). Il rischio, quindi, di essere morsi dai flebotomi è maggiore durante l'estate, quando c'è anche un maggiore movimento di turisti nel sud Italia e, in generale, nell'area mediterranea.

*P. perniciosus* è una specie antropofila e zoofila e risulta presente in ambiente domestico in aree urbane e periurbane (prevalenza 65,6%) ma anche rurali, nonché in ambiente silvestre, distante dalle abitazioni (prevalenza 21,8%) (Biocca *et al.*, 1977; Maroli *et al.*, 1994). La facilità con la quale *P. perniciosus* è in grado di colonizzare differenti aree, e ambienti contigui, la sua vasta diffusione, potrebbero spiegare la sua alta capacità vettoriale e lo renderebbero una delle specie di flebotomi più interessanti dal punto di vista epidemiologico. Esso, infatti, è in grado di diffondere la leishmania da un focolaio all'altro. La sua plasticità biologica spiega perché è uno delle specie di vettori più ubiquitari nel sud Europa ed il maggior vettore di *L. infantum* nel Vecchio Mondo (Ready, 2010).

Dati sull'infezione naturale offrono una prova ulteriore del fatto che *P. perniciosus* può trasmettere diversi zimodemi di *L. infantum*, i quali possono causare nell'uomo entrambe le forme di leishmaniosi: viscerale e cutanea (Gradoni *et al.*, 1991).

*P. perfiliewi*, appare frequente solo negli ambienti domestici con una prevalenza del 25,5% (se rilevata con trappole oleate) e dell'88,1% (se rilevata con trappole luminose); in ambienti selvatici la presenza della specie, risultata dalla cattura con trappole oleate, è stata solo dello 0,5% (Maroli *et al.*, 1987). *P. perfiliewi* è il vettore più probabile della leishmaniosi cutanea dell'uomo (Maroli *et al.*, 1987).

*P. neglectus*, è sospettato di trasmettere la leishmaniosi viscerale e la leishmaniosi canina. Dati recenti mostrano una presenza in aree peri-urbane del sud Italia (Capelli *et al.*, 2004).

Studiosi, indicano, inoltre, che distribuzione e abbondanza dei flebotomi non sono influenzati solo da fattori climatici, ma anche da altri fattori ambientali (ad esempio, la presenza e l'abbondanza di potenziali siti di riproduzione) e dalla disponibilità di ospiti adatti, che, in ultima analisi, hanno un impatto sulla loro ecologia (Viviana D. Tarallo *et al.*, 2010).

Così, la diffusione della leishmaniosi nelle aree urbane è favorita dalla capacità di adattamento dei flebotomi ad ambienti umani modificati. La comprensione delle interazioni che avvengono tra cambiamenti ambientali nelle zone urbane e i vettori è un prerequisito per lo sviluppo di adeguate azioni di prevenzione e strategie di controllo. Esiste una relazione tra presenza del flebotomo vettore, e trasmissione della malattia (**Tabella 3 A e B**).

Geographical distribution	Causative species	Disease form	Sandfly vector
North Africa, central and west Asia	<i>L. major</i>	Rural, zoonotic, cutaneous leishmaniasis, or oriental sore	<i>P. papatasi</i> , <i>P. duboscqi</i> , <i>P. salehi</i>
Central & west Asia and western India	<i>L. tropica</i>	Urban, anthroponotic cutaneous oriental sore	<i>P. sergenti</i>
Ethiopia and Kenya	<i>L. aethiopica</i>	Cutaneous leishmaniasis, diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>P. longipes</i> , <i>P. pedifer</i>
Indian subcontinent, (India, Nepal, Bangladesh) and east Africa	<i>L. donovani</i>	Visceral leishmaniasis, kala-azar, post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL)	<i>P. argentipes</i> , <i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>
Mediterranean basin, central & west Asia	<i>L. infantum</i>	Infantile visceral leishmaniasis	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i>

A) Sharma e Singh, 2008. J Vector Borne Dis.

**Table 1. Human pathogenic species of *Leishmania* and their vectors in New World and clinical manifestations and their geographical distribution**

Country	Species of <i>Leishmania</i>	Disease caused	Sandfly vector
Argentina	<i>L. (L.) chagasi</i>	VL	<i>Lu. longipalpis</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l.</i>	CL	<i>Lu. intermedia</i>
Belize	<i>L. (L.) mexicana</i>	CL	<i>Lu. olmeca olmeca</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l.</i>	CL	<i>Lu. ovallesi</i>
Bolivia	<i>L. (L.) amazonensis, chagasi</i>	CL, ADCL VL	<i>Lu. flaviscutellata, Lu. longipalpis,</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l. yucumensis and llanosmartini</i>	CL, MCL	<i>Lu. carrerai carrerai,</i>
Brazil	<i>L. (L.) amazonensis, chagasi</i>	CL, ADCL, MCL & VL VL	<i>Lu. flaviscutellata Lu. longipalpis</i>
	<i>L. (V.) braziliensis, guyanensis, lainsoni, naiffi, and shawi</i>	CL, MCL CL, MCL CL CL CL	<i>Lu. wellcomei Lu. umbratilis Lu. ubiquitous Lu. ayrozai Lu. whitmani</i>
Colombia	<i>L. (L.) amazonensis, chagasi &amp; mexicana</i>	CL, ADCL VL	<i>Lu. flaviscutellata Lu. evansi</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l., colombiensis, guyanensis &amp; panamensis</i>	CL, ADCL CL, MCL CL CL CL, MCL	<i>Lu. columbiana Lu. spicrassa Lu. hartmanni Lu. umbratilis Lu. trapidoi</i>
Costa Rica	<i>L. (L.) mexicana</i>	CL	<i>Lu. olmeca olmeca</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l. &amp; panamensis</i>	CL, MCL CL	<i>Lu. trapidoi Lu. trapidoi</i>
Dominican	<i>L. (L.) mexicana-like</i>	ADCL	unknown
Ecuador	<i>L. (L.) mexicana</i>	CL	<i>Lu. ayacuchenensis</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l.</i>	CL, MCL	<i>Lu. gomezi &amp; Lu. trapidoi</i>
El Salvador	<i>L. (L.) chagasi &amp; mexicana</i>	VL & CL	<i>Lu. longipalpis</i>
French Guyana	<i>L. (L.) amazonensis</i>	CL, ADCL	<i>Lu. flaviscutellata,</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l., guyanensis &amp; naiffi</i>	CL, MCL CL CL	<i>Lu. whitmani Lu. umbretilis Lu. squamiventris</i>
		<i>Lu. paraensis</i>	
Guadeloupe	<i>L. (L.) chagasi</i>	VL	<i>Lu. longipalpis</i>
Guatemala	<i>L. (L.) chagasi</i>	VL,	<i>Lu. olmeca olmeca</i>
	<i>L. (L.) mexicana</i>	CL	<i>Lu. ylephiletor, Lu. olmeca &amp; cruciata</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l.</i>	CL	<i>Lu. ovallesi</i>
Guyana	<i>L. (V.) guyanensis &amp; Leishmania sp.</i>	CL MCL	<i>Lu. umbretilis, anduzei Lu. whitmani</i>

B) Sharma e Singh, 2008. J Vector Borne Dis.

**Tabella 3:** E' mostrata la distribuzione geografica delle specie di vettore, della *Leishmania spp.* e delle

Honduras	<i>L. (L.) chagasi</i> &	VL, CL	<i>Lu. olmeca olmeca</i>
	<i>L. (L.) mexicana</i>	CL, ADCL	<i>Lu. olmeca olmeca</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l.</i>	CL, MCL	<i>Lu. ovallesi</i>
	<i>L. (V.) panamensis</i>	CL, MCL	<i>Lu. hartmanni</i>
Martinique	<i>L. (L.) sp.</i>	CL	<i>Lu. whitmani</i>
Mexico	<i>L. (L.) chagasi, mexicana</i> & other sp	VL, CL, ADCL	<i>Lu. longipalpis, Lu. olmeca olmeca</i>
Nicaragua	<i>L. (L.) chagasi</i>	VL	<i>Lu. longipalpis</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l.</i>	CL, MCL	<i>Lu. ylephiletor</i>
	<i>L. (V.) panamensis</i>	CL, MCL	<i>Lu. panamensis</i>
Panama	<i>L. (L.) aristedesii</i>	CL	<i>Lu. trapidoi</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l.,</i>	CL	<i>Lu. ovallesi</i>
	<i>panamensis</i>	CL	<i>Lu. gomezi</i>
	other <i>Leishmania</i> sp.	MCL	<i>Lu. panamanensis</i>
Paraguay	<i>L. (L.) amazonensis</i>	CL, ADCL	<i>Lu. flaviscutellata</i>
	<i>L. (L.) chagasi</i>	VL	<i>Lu. longipalpis</i>
Peru	<i>L. (V.) braziliensis s.l.</i>	CL, MCL	<i>Lu. whitmani</i>
	<i>L. (V.) peruviana</i>	CL	<i>Lu. peruensis &amp; verrucarum</i>
Surinam	<i>Leishmania</i> sp.	CL	<i>Lu. flaviscutellata</i>
USA	<i>L. (L.) mexicana</i>	CL, ADCL	<i>Lu. olmeca olmeca</i>
Venezuela	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	VL	<i>Lu. evansi</i>
	<i>L. (L.) garnhami,</i>	CL	<i>Lu. youngi,</i>
	<i>L. (L.) pifanoi</i>	CL, ADCL	<i>Lu. olmeca bicolor</i>
	<i>L. (L.) venezuelensis</i>	CL	<i>Lu. spinicrassa</i>
	<i>L. (V.) braziliensis s.l.</i>	CL, MCL	<i>Lu. umbralitis</i>
	<i>L. (V.) colombiensis,</i>	VL	<i>Lu. hartmanni</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	CL	<i>Lu. ovallesi</i>	

**Tabella 3:** E' mostrata la distribuzione geografica delle specie di vettore, della *Leishmania spp.* e delle manifestazioni cliniche nell'uomo; **A)** si riferisce al Vecchio Mondo, **B)** si riferisce al Nuovo Mondo.

### 3 - La trasmissione

In Europa ci sono solo due cicli di trasmissione con provato endemismo a lungo termine (Ready, 2008; Desjeux, 1991): Leishmaniosi umana (HumL) zoonotica viscerale e cutanea causata da *L. infantum* in tutta la regione mediterranea e, Leishmaniosi antroponotica cutanea umana causata da *L. tropica* che si sta verificando sporadicamente in Grecia (Ready, 2010).

Entrambe le forme costituiscono importanti problemi di sanità pubblica mentre la leishmaniosi viscerale zoonotica è anche un importante problema veterinario.

Queste due grandi categorie sono raggruppate a seconda della fonte di infezione umana: le leishmaniosi zoonotiche, in cui l'ospite definitivo, serbatoio, è dato da animali selvatici, commensali o animali domestici, e le leishmaniosi antroponotiche, in cui l'ospite serbatoio è l'uomo. La maggior parte dei casi appartiene al primo gruppo.

In generale, per far sì che la catena infettiva permanga e si perpetui in una popolazione (garantisca cioè la sopravvivenza del protozoo), il parassita deve avere un habitat naturale in cui riprodursi e l'opportunità di diffondere ad altri ospiti suscettibili. Necessita, quindi, di un serbatoio d'infezione o *reservoir*, in cui di norma risiede, si moltiplica e da esso, primariamente, dipende per la sopravvivenza.

In tutto il mondo, la maggior parte dei cicli di trasmissione zoonotici, coinvolgono animali, come roditori, marsupiali, scimmie, cani e canidi selvatici (WHO, 1990).

Alcuni studi hanno riscontrato animali selvatici quali lupo, volpe (Rioux *et al.*, 1968) e roditori (topi e il ratto nero) (Helal *et al.*, 1987; Bettini *et al.*, 1980), in cui è stata isolata la *L. infantum* e che si è supposto possano fungere da "serbatoio".

È stata proposta l'esistenza di un ciclo selvatico autonomo o semi-autonomo nel bacino del Mediterraneo dopo il ritrovamento di volpi infette nel sud della Francia, in Italia, Spagna e Portogallo.

Il cane potrebbe rappresentare l'anello che unisce ciclo selvatico (mantenuto da serbatoi selvatici e flebotomi) e ciclo domestico.

L'eventuale partecipazione di altri ospiti serbatoio, compresi soggetti infetti asintomatici (Costa *et al.*, 2002) e altri animali domestici come i gatti (Maroli *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2008; Mancianti, 2004), nel ciclo di trasmissione di *L. infantum* non può essere esclusa.

I gatti domestici potrebbero essere ospiti secondari di *L. infantum* nel sud dell'Europa (Marty *et al.*, 2007).

Molti studi hanno confermato il ruolo del cane domestico come principale reservoir dell'agente eziologico della Leishmaniosi viscerale in Cina, nel bacino del Mediterraneo e in America (Ashford, 1996; Moreno e Alvar, 2002; Desjeux, 2004; Gramiccia e Gradoni, 2005; Lainson e Rangel, 2005; Dantas-Torres e Brandao-Filho, 2006). Il cane è il solo reservoir di principale importanza in ambito veterinario.

Il cane è un efficiente serbatoio perchè:

- spesso è sensibile all'infezione *L. infantum* (Moreno e Alvar, 2002), anche se alcune razze sembrano essere più resistenti di altre;
- nelle zone in cui la leishmaniosi viscerale zoonotica è endemica, la prevalenza di infezione da *L. infantum* nei cani è spesso elevata, con un'alta percentuale di casi asintomatici (Dantas-Torres *et al.*, 2006);
- possono presentare un parassitismo cutaneo intenso, aumentando la possibilità di trasmissione (Ashford, 1996; Dantas-Torres e Brandao-Filho, 2006);
- vivono vicino o dentro le abitazioni dell'uomo, raggiungendo alte densità nel territorio e questo favorisce il mantenimento del ciclo domestico di trasmissione di *L. infantum* (Dantas-Torres e Brandao-Filho, 2006);
- possono rimanere infetti senza mostrare evidenti segni clinici di leishmaniosi viscerale per anni e anche per tutta la loro vita (Moreno e Alvar, 2002);
- lo zimodema MON-1 di *L. infantum*, che è responsabile della maggior parte dei casi di leishmaniosi viscerale in tutto il bacino del Mediterraneo, è anche lo zimodema predominante isolato da cani (Pratlong *et al.*, 2004).

E' stato dimostrato che sia i cani asintomatici che quelli sintomatici possono infettare i flebotomi (Molina *et al.*, 1994) e mantengono l'infettività anche dopo la terapia e dopo la completa guarigione clinica (Alvar *et al.*, 1994).

A differenza della leishmaniosi antroponotica, l'uomo nella leishmaniosi zoonotica è considerato come ospite accidentale o occasionale che non contribuisce alla trasmissione e si infetta per puntura del flebotomo che ha succhiato il sangue del cane parassitato.

<b>Specie di <i>Leishmania</i></b>	<b>Malattia nell'uomo</b>	<b>Distribuzione geografica</b>	<b>Principali serbatoi</b>
<i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i> )	Leishmaniosi viscerale; Leishmaniosi cutanea localizzata	Bacino del Mediterraneo, Asia medio-orientale e centrale fino al Pakistan, Cina, America centrale e meridionale	Cane
<i>L. major</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Nord Africa, Asia medio-orientale e centrale, Africa sub sahariana, savane	Roditori Gerbillidae, vari roditori
<i>L. aethiopica</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata e diffusa	Etiopia, Kenia	Irace
<i>L. mexicana</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	America centrale	Roditori selvatici
<i>L. amazonensis</i> (sin. <i>L. ganhami</i> , <i>L. pifanoi</i> )	Leishmaniosi cutanea localizzata e diffusa	Sud-America, Amazzonia settentrionale	Roditori selvatici
<i>L. venezuelensis</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Venezuela	Sconosciuto
<i>L. braziliensis</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata, Leishmaniosi mucocutanea	America centrale e meridionale, Messico	Numerosi mammiferi delle foreste pluviali
<i>L. guyanensis</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Guyana, Brasile	Bradipi
<i>L. lainsoni</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Brasile, Bolivia, Perù	Roditori
<i>L. naiffi</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Brasile, Guyana francese, Ecuador, Perù	Armadilli
<i>L. panamensis</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata, Leishmaniosi mucocutanea	America centrale, Columbia, Ecuador	Bradipi
<i>L. peruviana</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Ande peruviane	Cane
<i>L. shawi</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Brasile	Mammiferi boschivi

Gramiccia e Gradoni. 2005, Int. J. Parasitol.

**Tabella 4:** Sono riportate le specie responsabili della leishmaniosi zoonotica con indicazione del principale serbatoio d'infezione e della distribuzione geografica.

La **Tabella 4** mostra tra le 15 specie riconosciute infettive per l'uomo le 13 che hanno natura zoonotica.

Per le due specie che hanno una trasmissione esclusivamente antroponotica, come la *L. donovani* (leishmaniosi viscerale) e la *L. tropica* (leishmaniosi cutanea), è stata osservata la presenza di un ospite animale serbatoio in alcune zone endemiche, come, il Sudan orientale per la *L. donovani* (Dereure *et al.*, 2003), il Marocco, l'Israele settentrionale e l'Iran per la *L. tropica* (Dereure *et al.*, 1991, Jacobson *et al.* 2003, Mohebbi *et al.* 2005)

Comunque la via di trasmissione naturale, principale, per *L. infantum*, come per altre *Leishmanie spp.*, si attua attraverso la puntura di femmine ematofaghe di flebotomi. Il

flebotomo, infatti, effettuando il pasto di sangue da un animale infetto può trasmettere l'infezione durante un pasto di sangue successivo (Bates, 2007) inoculando i promastigoti metaciclici. Dalla cute, sito primario d'infezione nei mammiferi ospiti, i promastigoti, sono fagocitati da parte di macrofagi e cellule correlate. In essi si trasformano in amastigoti e spesso provocano una ulcera cutanea e lesioni al sito del morso.

Nel nostro paese, non esiste contagio inter-umano né diretto (uomo-uomo), né indiretto (uomo - flebotomo - uomo) e ciò perché le leishmanie nell'organismo umano si localizzano principalmente negli organi del sistema reticolo-endoteliale (fegato, milza, midollo osseo, linfonodi).

#### **Altre possibili vie di trasmissione:**

Per l'uomo si sono riscontrati casi eccezionali di trasmissione tramite le vie veneree (Symmers, 1960), la via congenita (Eltoum *et al.*, 1992), trasfusione di sangue (Cardo, 2006; Bruce-Chwatte, 1972), o tramite scambio di siringhe infette tra tossicodipendenti (Chicharro *et al.*, 1999). Non si esclude un'altra via di contagio come l'ingestione volontaria o accidentale dei flebotomi infettanti (Killick- Kendrick, 2002).

Per quanto riguarda il cane, sono state documentate trasmissioni: attraverso trasfusioni di sangue (De Freitas *et al.*, 2006); congenite dalla madre al cucciolo, anche se sembra essere rara (Mancianti e Sozzi, 1995; Diniz *et al.*, 2005); sperimentali transplacentari in cuccioli nati da *beagle* (maschio e femmina) infetti (Rosypal *et al.*, 2005). Le indagini in cani naturalmente infetti, tuttavia, hanno riportato dati in conflitto (Andrade *et al.*, 2002).

In ultimo, in questi ultimi anni, modalità di trasmissione secondaria, sono state oggetto di discussioni e speculazioni, ma hanno anche portato a conclusioni fuorvianti sul ruolo delle zecche (*Rhipicephalus sanguineus*) come vettori di *Leishmania*. Sono necessarie ulteriori ricerche per capire meglio la loro partecipazione alla epidemiologia della leishmaniosi (Filipe Dantas-Torres, 2011).

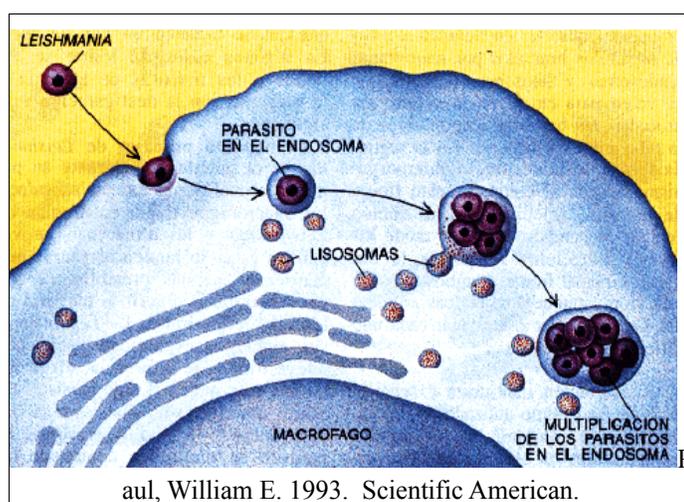
L'ipotesi che la leishmaniosi può essere trasmessa attraverso il morso di ematofagi invertebrati diversi flebotomi (es. pulci, zecche) non è supportata da convincenti evidenze sperimentali (WHO Technical Report Series 949, 2010).

## 4 - Patogenesi

Quando il flebotomo punge l'uomo o il mammifero durante il pasto di sangue, inocula le leishmanie (promastigoti metaciclici) nel suo derma, così, inizia l'interazione ospite parassita. L'organismo, a questo punto, mette in atto il primo sistema di difesa: la fagocitosi del parassita da parte dei macrofagi cutanei residenti.

Il macrofago circonda il parassita in un vacuolo, fagosoma, che fondendosi con il lisosoma forma il fagolisosoma o vacuolo parassitoforo. In esso, la cellula, cerca di eliminarlo attraverso una cascata di metaboliti a base di ossigeno, come l'ossido nitrico, e attraverso la liberazione di idrolasi lisosomiali scaricate all'interno del vacuolo parassitoforo. La *Leishmania* può eludere queste difese non specifiche sopravvivendo e moltiplicandosi all'interno dei macrofagi (Handman *et al.*, 2002).

In queste prime fasi, in un tempo piuttosto breve, e attraverso significativi cambiamenti biochimici e metabolici, passano alla forma amastigote (requisito importante per lo stabilirsi dell'infezione), si moltiplicano fino a riempire tutta la cellula ospite e ne provocano la lisi (**Figura 6**). Si ha, così, l'invasione di nuovi fagociti mononucleati che fungono da veicolo per il passaggio in circolo e il raggiungimento degli organi del sistema reticolo-endoteliale (fegato, milza, midollo, linfonodi).



**Figura 6:** Rappresentazione schematica della moltiplicazione della *Leishmania spp.* nell'endosoma.

All'interno dell'organismo, l'adesione alla membrana cellulare dei promastigoti ai macrofagi è mediata, con meccanismi complessi, da diverse molecole di superficie del

protozoo, quale il lipofosfoglicano (LPG), la glicoproteina GP63, e la fibronectina e da recettori specifici presenti sui macrofagi, tra cui i recettori del complemento CR 1 e 3, recettori della fibronectina e recettori simil-Toll TLR2 (Beverley e Turco, 1998; Mosser *et al.*, 1997; 1987).

Questi ultimi sembrano avere un'influenza nel regolare negativamente percorsi che portano alla soppressione dell'espressione di alcune citochine (Ranadhir *et al.*, 2007).

Diversi studi mostrano che le molecole di superficie del protozoo, sopra citate, subiscono dei profondi rimaneggiamenti durante il processo di metaciclogenesi e si suppone che questi cambiamenti facciano acquisire al parassita maggiore virulenza (Chang e McGwire, 2002).

E' stato dimostrato che in realtà le prime cellule che fagocitano le forme promastigote sono i granulociti neutrofili, richiamati nel sito d'infezione, i quali fagocitano, senza uccidere il microrganismo. Questi granulociti producono citochine che attraggono i macrofagi i quali a loro volta li fagocitano e quindi la *Leishmania*, internalizzata tramite questa via indiretta, riesce a resistere, sopravvivere e moltiplicarsi fino a provocare la distruzione della cellula parassitata.

Le leishmanie resistono all'attività fagocitaria del macrofago grazie a diversi meccanismi.

All'interno dei macrofagi, il promastigote perde il flagello e riassume la forma di amastigote. La trasformazione in amastigote è probabilmente stimolata dal cambiamento di temperatura (da 31 fino a 37°C negli organi interni) e da altri fattori poco noti.

Il parassita mette in atto meccanismi mediati dalle molecole di superficie GP63, LPG in grado di influenzare la fusione del fagolisosoma del macrofago.

Gli amastigoti, metabolicamente più attivi in ambiente acido (caratteristico del fagolisosoma), risultano possedere una certa refrattarietà, della parete, ai metaboliti cellulari prodotti, e la capacità di produrre, localmente, sostanze ad azione anti-enzimatica in grado di inibire l'attività del macrofago stesso. In particolare, sono presenti due molecole la superossido dismutasi e la perossidocina che si ritiene possano ridurre i derivati dei nitriti (cioè, specie reattive dell'azoto) e le sostanze intermedie reattive dell'ossigeno. Inoltre, le concentrazioni di regolatori di alcune proteine chinasi PKC, come lo ione calcio e il diacilglicerolo, sono alterate. Ne consegue l'inattivazione del complesso NADPH ossidasi, sito, sulla membrana del fagolisosoma e di conseguenza l'inibizione del *burst* ossidativo, richiesto per l'uccisione del parassita (Ranadhir *et al.*, 2007).

Un'altro dei meccanismi con cui questi parassiti possono sfuggire alla risposta immunitaria protettiva dell'ospite è la perdita della capacità del macrofago di processare e presentare l'antigene. E' essenziale, per il controllo dell'infezione da *Leishmania spp.*, l'espansione dei linfociti Th1 CD4+ che avviene grazie alla presentazione dell'antigene attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità II (MHCII), che le cellule effettuano andando a stimolare i linfociti T. E' stato dimostrato che *L. donovani* sopprime l'espressione del MHCI nei macrofagi infettati, mentre, cellule infettate con *L. amazonensis* e *L. major* mostrano un processamento difettivo dell'antigene esogeno (James Alexander *et al.*, 1999).

La progressione dell'infezione dipende dall'efficienza della risposta immunitaria cellulo-mediata ed umorale dell'ospite (Alvar *et al.*, 2004).

Molti altri fattori, comunque, possono influenzare l'esito dell'infezione e la patogenesi, come ad esempio: il vettore (ripetute punture infettive soprattutto nei cani, l'iniezione intradermica di saliva dei flebotomi), il parassita (virulenza) e l'ospite (componenti genetiche, risposta immunitaria, profili delle citochine, condizioni nutrizionali, altre patologie concomitanti) (Banuls *et al.*, 2007; Manolis N. Saridomichelakis, 2009).

Di seguito si prendono in esame i differenti fattori:

**-Vettore.** Studi mostrano come la saliva iniettata attraverso la puntura può essere un momento importante che contribuisce al meccanismo patogenetico. Infatti, il flebotomo non si limita all'inoculazione meccanica, passiva, dei promastigoti, ma ne promuove attivamente l'iniziale penetrazione e la successiva propagazione. Le sostanze della saliva dell'insetto comprendono componenti farmacologicamente potenti come, vasodilatatori, inibitori della coagulazione del sangue, anestetici locali e fattori con proprietà immunomodulanti che facilitano l'instaurarsi dell'infezione da parte della *Leishmania* (Ribeiro, 1989; Theodos e Titus 1993; Lerner *et al.*, 1991; Hall e Titus, 1995; Sacks e Kamhawi, 2001).

E' stato osservato un effetto inibitore sul sistema del complemento in estratti salivari ottenuti da flebotomi delle specie *Lutzomyia longipalpis* e *L. migonei* (Cavalcante *et al.*, 2003).

**-Parassita.** La virulenza di un agente patogeno è definito dal suo grado di patogenicità, e dalla sua capacità di stabilire e mantenere l'infezione. Il protozoo della *Leishmania spp.* ha sviluppato meccanismi molecolari indispensabili allo stabilirsi dell'infezione. Essi sono mediati da determinanti invasivi/evasivi, rappresentati, in gran parte, da

molecole di superficie e secrete delle cellule del parassita, e coinvolgono le fasi di legame, ingresso, sopravvivenza e moltiplicazione nel macrofago.

Determinanti patoantigenici, rappresentati da molecole citoplasmatiche altamente conservate, sono responsabili di meccanismi che portano alla risposta immune. Questi, quindi, possono determinare l'immunopatologia manifesta sotto forma di segni o sintomi clinici (Chang *et al.*, 2003; Kebaier *et al.*, 2001; Garin *et al.*, 2001; Ranadhir *et al.*, 2007).

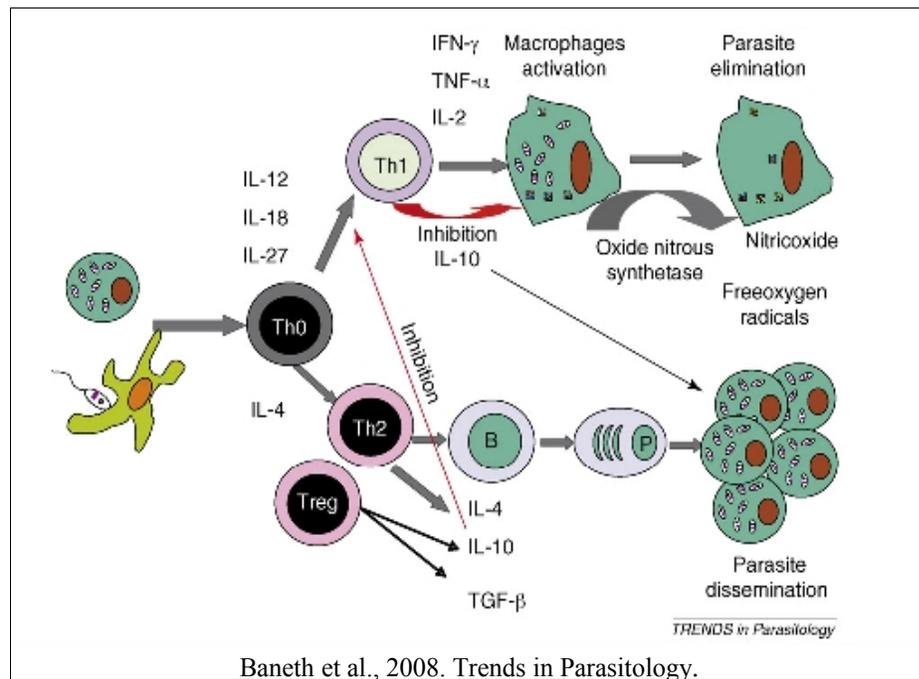
**-Ospite.** La predisposizione genetica gioca senza dubbio un ruolo importante nel determinare gli esiti della malattia. Studi nei topi e nell'uomo hanno dimostrato che più loci genetici influenzano il successo dell'infezione, coinvolgendo anche la risposta immunitaria acquisita e innata contro il parassita.

Diversi studi sperimentali *in vivo* e *in vitro* effettuati in ospiti di specie diverse mostrano che la competenza immunologica dell'individuo è indispensabile per combattere la crescita del parassita in esame.

In ospiti normorecettivi il protozoo stimola l'attivazione delle difese immunitarie sia umorali (anticorpi anti-*Leishmania* a titolo elevato già nelle prime fasi della malattia) che cellulo-mediate. Studi sperimentali hanno dimostrato che l'esito dell'infezione è strettamente connesso al tipo di risposta immune che viene innescata. L'immunità protettiva è, infatti, cellulo-mediata (linfociti T CD4+) ed in particolare il controllo dell'infezione, l'evoluzione della malattia o la guarigione, sono legati al fenotipo T helper (Th) attivato (Liew *et al.*, 1990). I linfociti T CD4+ sono responsabili del riconoscimento degli antigeni presentati dalle cellule APC (*Antigen Presenting Cells*). Le cellule che presentano l'antigene possono essere macrofagi tissutali, cellule di Langherans, cellule dendritiche o cheratinociti; queste cellule, una volta fagocitate le Leishmanie, le demoliscono e ne processano gli antigeni, che espongono poi in superficie, presentandoli ai linfociti T helper. Nell'ambito della popolazione dei linfociti T CD4+ si hanno due sottopopolazioni (fenotipiche) (**Figura 7**): i linfociti Th1 ed i Th2. I primi (Th1), se attivati, determinano un'evoluzione benigna dell'infezione perché proteggono l'organismo attraverso l'elaborazione di citochine (interferone gamma, IFN- $\gamma$ , interleuchina IL-2, *tumor necrosis factor* TNF- $\alpha$ , IL-12) che stimolano l'attività dei macrofagi.

Al contrario le citochine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ed il fattore di stimolazione dei linfociti B) prodotte dai secondi (Th2) non proteggono l'organismo dall'aggressione delle leishmanie perché richiamano, nel sito di partenza dell'infezione, macrofagi

immaturi a bassissimo potenziale antiparassitario; pertanto favoriscono l'evoluzione della malattia, in quanto permettono una persistenza delle leishmanie, “protette” all'interno dei macrofagi, ed una loro diffusione sistemica (Pinelli *et al.*, 1994). La questione fondamentale, sostanzialmente insoluta, riguarda la conoscenza dei fattori che inducono una risposta prevalentemente Th1, associata alla risoluzione dell'infezione e quindi alla protezione dei soggetti infetti, o prevalentemente Th2, responsabile della progressione dell'infezione verso la malattia.



**Figura 7:** Rappresentazione schematica della maturazione e differenziazione dei linfociti helper 1 e 2. Sono indicate le citochine coinvolte e la risposta immunologica.

La maggior parte degli studi sulla risposta immunitaria all'infezione da *Leishmania* sono stati condotti sui topi. È emerso che in topi infetti con *Leishmania major*, il predominio della risposta Th1 o Th2 può determinare la resistenza o la suscettibilità alla malattia. Infatti, dopo l'infezione i topi dei ceppi resistenti al protozoo producono grosse quantità di IFN-γ in risposta agli antigeni di *Leishmania*, mentre i ceppi suscettibili, cioè colpiti da leishmaniosi ad esito fatale, producono maggiori quantità di IL-4 in risposta all'infezione. L'IFN-γ attiva i macrofagi ed incrementa la distruzione intracellulare di *Leishmania*, mentre livelli elevati di IL-4 inibiscono l'attivazione dei macrofagi. Il trattamento di topi suscettibili con IL-12 al momento dell'infezione è in grado di indurre resistenza.

Le cellule *natural killer* (NK) attivate da IL-12 espressa dai macrofagi (o cellule dendritiche) sono la fonte primaria di IFN- $\gamma$  precoce che, non solo gioca un ruolo importante nel controllare la precoce resistenza a *L. major*, ma è anche coinvolta nel promuovere la differenziazione Th1 nei topi resistenti.

Il dicotomico modello Th1/Th2 nello sviluppo della malattia dimostrato per *L. mexicana* e *L. major* non è stato osservato nella leishmaniosi viscerale del topo e dell'uomo causata da *L. donovani*. Anche se la resistenza alle infezioni di *L. donovani* è associata alla produzione di IFN- $\gamma$ , citochine tipiche del fenotipo Th2 non determinano la suscettibilità. Infatti, topi IL-4<sup>-/-</sup> sono leggermente più suscettibili alle infezioni di *L. donovani* che topi controllo *wild-type*. In questo contesto IL-4 può avere un ruolo protettivo contro la leishmaniosi viscerale (James Alexander *et al.*, 1999).

Per quanto concerne la situazione nel cane, la leishmaniosi canina, in forma sintomatica, è stata associata ad alterazioni immunitarie a carico delle cellule T (Barbiéri, 2006).

Queste alterazioni comprendono: una mancata reazione di ipersensibilità ritardata agli antigeni di *Leishmania* (Cardoso L. *et al.*, 1998; Pinelli *et al.*, 1994; Solano-Gallego *et al.*, 2000), calo della conta di linfociti T nel sangue periferico (Pinelli *et al.*, 1994; De Luna *et al.*, 1999; Martínez-Moreno *et al.*, 1995), mancata produzione di interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleuchina 2 (IL-2) da parte delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) *in vitro* (Pinelli *et al.*, 1994, 1995, 1999; Santos-Gomes *et al.*, 2002).

Negli animali sintomatici inoltre è stata evidenziata la presenza di elevati titoli anticorpali anti-*Leishmania*, del tutto privi di attività protettiva (Pinelli *et al.*, 1994; Martínez-Moreno A. *et al.*, 1995; Abranches *et al.*, 1991; Barbiéri, 2006).

In questi soggetti ammalati la continua sollecitazione delle cellule immunocompetenti, indotta dai parassiti posti al riparo nei fagociti, comporta uno squilibrio del sistema immunitario, con iperfunzione della risposta umorale (non protettiva), ed anomalie in quella cellulo-mediata. Questo determina uno stato immunopatologico caratterizzato essenzialmente da immunodepressione e produzione di immunocomplessi circolanti (De Luna *et al.*, 1999).

La resistenza alla leishmaniosi canina, nei cani infetti da *L. infantum*, è stata associata all'attivazione di linfociti Th1 in grado di produrre IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (Pinelli *et al.*, 1994), ed indurre, nei macrofagi, un'attività anti-*leishmania*.

Ancora poco studiato e non ben definito è il ruolo dell'IL-12 nell'induzione e nel mantenimento di una risposta di tipo Th1 e quello delle citochine Th2.

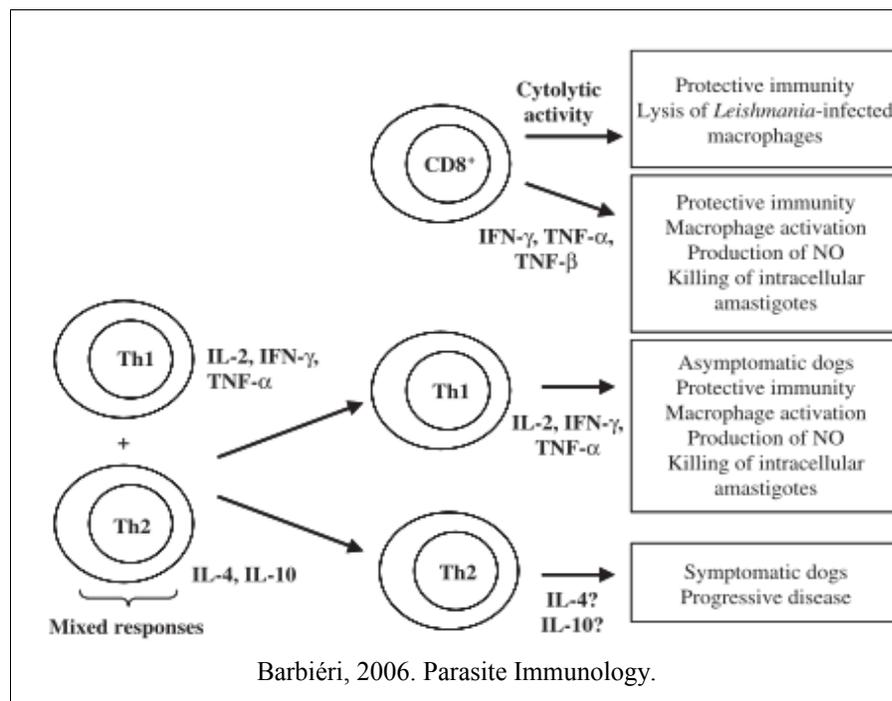
In cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) stimulate con l'antigene sono state osservate risposte miste Th1 e Th2, in cani asintomatici, ed è stata dimostrata la presenza di trascritti mRNA di IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10.

Nonostante l'IL-10 secreta da cellule T CD25+CD4+ sia stata ritenuta coinvolta nella leishmaniosi murina ed umana, nella leishmaniosi canina il coinvolgimento di queste cellule non è ancora ben chiaro.

In cani naturalmente infetti con *L. infantum* è stata osservata una riduzione sia della popolazione CD4+ che CD8+ e il ripristino di valori fisiologici è avvenuto solamente dopo il trattamento farmacologico (Bourdoiseau G. *et al.*, 1997).

L'assenza di una risposta immunitaria cellulo-mediata costituisce un aspetto chiave nella patogenesi della malattia e nella sua progressione.

Come mostrato in **Figura 8**, possiamo dire che l'infezione da *Leishmania infantum* sembra indurre risposte miste Th1 e Th2 e l'equilibrio tra questi due percorsi ha un'importanza rilevante nel controllo della replicazione del protozoo come pure nella progressione e guarigione della malattia. Comunque la predominanza della risposta Th1 sembra correlata con la resistenza dei cani alla malattia. Un'immunità cellulo-mediata difettiva porta ad una moltiplicazione incontrollata del parassita e alla conseguente attivazione dei linfociti B, con la sovrapproduzione di immunoglobuline (Manolis N. Saridomichelakis, 2009).



**Figura 8:** schematizzazione della risposta mista Th1, Th2 e della possibile evoluzione dell'infezione nel cane.

Per quanto concerne la risposta immunitaria umorale, essa è presente in modo marcato in fase di leishmaniosi canina ed i livelli di immunoglobuline *Leishmania*-specifiche rilevate in cani sintomatici sono maggiori di quelli presenti in cani infetti ma asintomatici.

Una marcata associazione è stata trovata tra questi livelli, lo stato clinico e la densità del parassita nei tessuti (Reis *et al.*, 2006).

Molti studi hanno rivolto attenzione all'analisi dei livelli delle classi e sottoclassi di anticorpi e la possibile relazione con la presenza e/o severità di segni clinici. Attualmente però i risultati risultano confusi e discordanti.

In uno studio, ad esempio, è stata individuata una correlazione diretta tra l'induzione di alti livelli di anticorpi anti-*Leishmania* di tipo IgG1 e la comparsa dei segni clinici in cani con infezione da *L. infantum*, mentre la presenza di anticorpi di tipo IgG2 è stata associata a forme asintomatiche dell'infezione (Nieto G. *et al.*, 1999). In ogni caso questi risultati non sono stati confermati da altri studi in cui cani con reazioni cutanee positive di ipersensibilità ritardata hanno manifestato una risposta immunitaria polimorfica, variabile tra casi di sieronegatività fino a titoli positivi di IgG1 o IgG2 (Solano-Gallego *et al.*, 2000; Bourdoiseau *et al.*, 1997). Livelli elevati di IgG2 sono stati rinvenuti in cani sintomatici (Leandro C. *et al.*, 2001) e in cani brasiliani naturalmente infetti si è osservata una sovraregolazione di tutte le classi di IgG, nonostante le IgG2 fossero elevate in maniera minore (Quinnell R.J. *et al.*, 2003). Più recentemente, è stato dimostrato che in cani sintomatici provenienti da diverse aree endemiche è presente un'elevato titolo di IgE, accanto alle IgG1, il che renderebbe le prime potenziali marcatori d'infezioni attive (Almeida M.A.O. *et al.*, 2005; Iniesta L. *et al.*, 2005).

Amastigoti e promastigoti sono in grado di opporsi agli anticorpi sierici agganciandoli mediante gli antigeni di superficie e poi eliminandoli come immunocomplessi, al contempo ricostituendo, secondo un turnover assai breve (3,5 - 4 ore), gli antigeni di superficie andati perduti.

#### 4.1 - Patogenesi nel cane

La *Leishmania* può infettare molti differenti tipi di cellule, quelle del sistema dei fagociti mononucleati (macrofagi, cellule di Kupffer), le cellule dendritiche, fibroblasti, cellule endoteliali, epatociti, neutrofili, eosinofili e persino le cellule neoplastiche e quindi invadere quasi tutti i tessuti e gli organi del corpo, compreso il sistema nervoso centrale. I macrofagi, però, sono le principali cellule coinvolte nell'infezione e possono assolvere alla funzione di trasporto del parassita prima ai linfonodi regionali e poi al resto del corpo. La presenza di parassiti in numerosi siti dell'organismo causa reazioni che sono responsabili della comparsa di lesioni e di sintomi nella leishmaniosi canina.

Nella leishmaniosi canina (malattia multisistemica con segni clinici variabili), sono coinvolti molti differenti tessuti e organi del corpo attraverso l'infiammazione granulomatosa e/o meccanismi immuno-mediati (ad esempio auto-anticorpi, la deposizione di immuno-complessi).

L'infiammazione granulomatosa, caratterizzata da infiltrazione e/o da proliferazione di macrofagi, istiociti, linfociti, cellule plasmatiche e, talvolta, neutrofili ed eosinofili, sembra particolarmente importante per linfonodi, midollo osseo, milza, fegato, intestino, ossa, sistema genitale maschile e lesioni della mucosa (Barrouin-Melo *et al.*, 2006; Manolis N. Saridomichelakis, 2009).

Tali reazioni infiammatorie causano una progressiva alterazione ed uno squilibrio funzionale degli organi colpiti (Bourdeau *et al.*, 1988).

I meccanismi immuno-mediati, invece, sembrano avere un ruolo centrale nella patologia renale (Poli *et al.*, 1991).

Oltre alla produzione di anticorpi specifici è presente una certa quantità di crioglobuline e autoanticorpi. Il ruolo negativo di attivazione delle cellule B e la sovrapproduzione di immunoglobuline è esemplificata dalla formazione di immuno-complessi composti da IgG, IgM e/o IgA (Mancianti *et al.*, 1989).

Gli immuno-complessi, non solo riducono ulteriormente l'attività fagocitaria dei macrofagi, ma aggravano anche l'infiammazione attraverso l'attivazione del complemento e hanno un ruolo diretto nella immunopatologia di vari tessuti e organi. Infine, in un piccolo numero di casi, l'attivazione delle cellule B può anche causare deposizione di tessuto amiloide (Manolis N. Saridomichelakis, 2009).

L'abnorme produzione di anticorpi non protettivi porta a condizioni patologiche quali vasculiti, poliartriti, ulcerazioni cutanee e glomerulonefriti dovute al deposito degli immunocomplessi a livello della parete dei vasi. Anche fenomeni autoimmuni hanno un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia; è stata documentata la produzione di autoanticorpi verso eritrociti, trombociti e proteine nucleari(Keenan *et al.*, 1984; Lopez *et al.*, 1996).

Entrambi i meccanismi patogenetici, infiammazione granulomatosa e meccanismi immunomediati, hanno probabilmente un ruolo per pelle, muscoli, articolazioni e lesioni oculari.

La localizzazione nella cute e nei linfonodi regionali o la disseminazione, che può avvenire entro poche ore, dipende dalla resistenza o suscettibilità dell'animale(Ferrer, 2002).

Ogni segno clinico e anomalia d'analisi di laboratorio può riflettere una patologia d'organo singola o multipla o un più complesso pato-meccanismo(Manolis N. Saridomichelakis, 2009).

Nella disseminazione i parassiti sono rapidamente distribuiti ai linfonodi e alla milza per via linfatica o ematica, e da lì invadono il rene e il fegato. Successivamente si ha una diffusione agli organi riproduttivi, la pelle, il sistema digerente, respiratorio, ecc... (Alvar *et al.*, 2004).

Nei linfonodi si riscontra spesso, una linfadenopatia periferica che rappresenta uno dei segni più tipici della leishmaniosi canina.

I reni sono colpiti in quasi tutti i cani con leishmaniosi canina, e la malattia renale potrebbe essere l'unica anomalia evidente nei cani infetti, infatti, sono presenti studi in letteratura in cui si evidenziano glomerulonefriti anche in cani considerati asintomatici(Baneth *et al.*, 2008). A livello di rene, le lesioni sono caratterizzate da un danno tubulare e glomerulare conseguente alla risposta immunitaria. La malattia renale può progredire da proteinuria asintomatica alla sindrome nefrosica o insufficienza renale cronica con glomerulonefrite, nefrite tubulointerstiziale e amiloidosi(Koutinas *et al.*, 1999).

Le lesioni renali possono portare all'ipertensione che può amplificare la patologia e condurre alla sindrome nefrosica, ed insufficienza renale cronica, che è la più comune causa di morte nella leishmaniosi canina.

Le lesioni ossee sono comuni in cani infetti, dove si osservano tipicamente lesioni proliferative periostale e intramidollare con frequente osteolisi corticale e midollare.

La morfologia epatica è alterata con la presenza di infiltrati infiammatori e la formazione di granulomi, iperplasia e ipertrofia delle cellule di Kupffer(Alvar *et al.*, 2004).

L'infezione parassitaria induce alterazioni morfologiche negli epatociti, causando modificazioni del sistema endomembrana e del compartimento perossisomale, che esitano in alterazioni del metabolismo epatico(Vianna *et al.*, 2002). Contrariamente a cani resistenti, soggetti con leishmaniosi canina, mostrano granulomi del fegato non ben organizzati e non sono efficaci nell'eliminazione dei parassiti(Sanchez *et al.*, 2004). E' possibile in esami post-mortem riscontrare epatomegalie. Anomalie clinicopatologiche riscontrate come ipoalbuminemia e aumento delle attività degli enzimi sierici possono essere derivate dal danno al fegato.

La splenomegalia è una manifestazione molto comune. Nella milza l'infezione produce una disorganizzazione della polpa bianca. La polpa rossa diventa ipercellulare, con le plasmacellule e i macrofagi che parassitano nella zona marginale(Alvar *et al.*, 2004). La capsula e le trabecole risultano ispessite(Tafuri *et al.*, 2001). I linfonodi manifestano ipertrofia delle regioni corticale e midollare; i centri germinali sono composti da zone di iperplasia dipendenti dai linfociti B e da numerosi macrofagi, mentre l'area delle cellule T è depleta(Tafuri *et al.*, 2001). La milza è stata proposta come un organo fondamentale per permettere la sopravvivenza a lungo termine del parassita a causa di una risposta immunitaria inefficace(Lima *et al.*, 2007).

Si possono osservare lesioni in diverse strutture dell'occhio le cui manifestazioni sono: blefarite, congiuntivite, cheratite, cheratocongiuntivite secca, uveite e, forse, distacco di retina. A seconda della lesione, i meccanismi patogenetici possono includere: 1) l'infiammazione granulomatosa secondariamente alla presenza del parassita 2) deposizione di immunocomplessi 3) lesioni di altre strutture oculari 4) manifestazioni sistemiche di leishmaniosi canina (ad esempio, distacco di retina a causa di ipertensione sistemica(Manolis N. Saridomichelakis, 2009).

Le lesioni cutanee sono frequenti e sono associate a diversi tipi di risposta immunitaria. In corso di risposta che porta alla resistenza, è caratteristica la presenza a livello del derma di cellule di Langherans e cheratinociti esprimenti MHCII, di linfociti T, di macrofagi e di parassiti.

In corso di risposta che porta alla suscettibilità compaiono lesioni granulomatose in assenza di cellule presentanti l'antigene e con la presenza di numerosi macrofagi infetti(Fondevila *et al.*, 1997). Sempre a livello di cute sono stati osservati dei fibroblasti infetti che potrebbero svolgere un ruolo importante nella comparsa delle ulcere(Hervás-Rodríguez *et al.*, 1996).

L'anemia è l'anomalia ematologica più comune e può essere causata dalla perdita di sangue(ad es. epistassi), emolisi(auto-anticorpi, immuno-complessi, ridotta fluidità di membrana eritrocitaria), diminuita eritropoiesi(ad es. anemia di infezione cronica, carenza di ferro, insufficienza renale cronica, displasia eritroide) e malattie concomitanti(ad es. erlichiosi monocitica). Meccanismi simili sono proposti per la trombocitopenia.

Oltre a questi organi ne sono coinvolti molti altri anche se i riscontri sono meno frequenti.

L'amastigote è in grado di colpire le mucose (sono state osservate delle lesioni nodulari e ulcerative) a livello di lingua, di pene e di cavità orale (Font *et al.*, 1996) come pure compaiono nelle cellule muscolari(miofibre).

Si può riscontrare anche

L'infiammazione dei muscoli masticatori e scheletrici si manifesta con necrosi e atrofia muscolare, che è più pronunciata nei muscoli masticatori, ed è accompagnata da alterazioni elettromiografiche e, talvolta, da una maggiore attività sierica di creatinina fosfochinasi e lattato deidrogenasi(Vamvakidis C.D. *et al.*, 2000). Depositi di IgG, autoanticorpi contro le miofibrille e la presenza degli amastigoti nei macrofagi e nelle cellule muscolari sono alla base di questi disordini.

La meningite causata da *L. infantum* è stata descritta in associazione alla comparsa di anticorpi specifici per il parassita all'interno del fluido cerebrospinale(Viñuelas *et al.*, 2001).

Si pensa, negli umani, che la leishmaniosi canina sia assimilabile alla situazione, descritta, che si presenta in persone coinfectate con il virus dell'HIV e con il protozoo della *Leishmania*. L'assenza di difese in questi pazienti umani permette al parassita di diffondersi in localizzazioni atipiche(Alvar *et al.*, 1997), il che suggerisce che nel caso del cane una tale situazione è il risultato di una grave immunodepressione indotta dal parassita stesso; un'immunodepressione dapprima specifica nei confronti del parassita e

che però in seguito colpisce tutte le funzioni delle cellule T nell'animale colpito (De Luna *et al.*, 1999).

## 5 - Sintomatologia

La Leishmaniosi canina, presenta una sintomatologia alquanto polimorfa (diversità di sintomi in intensità e numero), si manifesta nella forma generalizzata, sistemica, detta anche viscerocutanea.

È una malattia che tende a cronicizzare e dopo una lunga fase debilitante, in assenza di intervento terapeutico, conduce l'animale alla morte.

I segni clinici ed il periodo della comparsa della malattia sono molto variabili, estendendosi dalla totale assenza di sintomi a forme cliniche molto gravi.

Risultano maggiormente colpiti cani di età compresa fra i 2 e i 7 anni, di ambo i sessi, che vivono in ambiente extradomestico; meno colpiti sono i soggetti al di sotto dei 9 mesi d'età, i cani meticci di razza autoctona ed i cani di piccola taglia (Koutinas *et al.*, 1999).

Nonostante il contagio si verifichi nei periodi di massima presenza dei flebotomi (Maggio-Ottobre), la malattia non assume un carattere di stagionalità in relazione probabilmente al lungo periodo di incubazione, che sperimentalmente, è stato visto variare da un minimo di 1 anno ad un massimo di 6 anni (Ferrer, 1999; Keenan *et al.*, 1984).

Altri studi su infezioni naturali mostrano che il periodo dell'incubazione dell'infezione varia da 2 a 8 mesi dalla puntura del flebotomo (Gaeta *et al.*, 1994), altri autori, tuttavia, riportano che il periodo d'incubazione si può estendere a 15 mesi (Rioux *et al.*, 1979), mentre Slappendel (1988) riporta casi (in paesi in cui non è presente la Leishmaniosi) che hanno sviluppato sintomi dopo 5-7 anni dalla visita in aree endemiche.

La caratteristica lesione istopatologica che si riscontra nella leishmaniosi canina è comunemente riferibile ad una reazione infiammatoria granulomatosa associata con la presenza nei macrofagi di amastigoti e che riguarda molti organi e tessuti (cute, linfonodi, fegato, milza, rene, occhi, surrene, pancreas, intestino, testicoli), compreso il sistema nervoso centrale.

Lanotte *et al.*, 1979 classificano la Leishmaniosi canina come acuta, subacuta, cronica o latente regressiva. Mancianti *et al.*, 1988 e Abranches *et al.*, 1991, classificano l'infezione in base alla sintomatologia clinica, in polisintomatico, oligosintomatico e asintomatico (preclinici e resistenti).

Alcuni autori ritengono questa classificazione con un valore limitato in quanto non considera alterazioni clinico-patologiche e ignora i cani che soffrono di disfunzione d'organo diffusa senza apparenti manifestazioni visive (Baneth, 2008).

Tali studiosi definiscono cani con leishmaniosi clinica i soggetti che presentano segni clinici e/o anomalie clinicopatologiche e hanno un'infezione da *L. infantum* confermata, mentre definiscono cani con infezione subclinica o cani infetti, clinicamente sani, quelli che non presentano segni clinici né all'esame fisico, né anomalie clinicopatologiche con prove di laboratorio di routine (emocromo, profilo biochimico e analisi delle urine), ma hanno un'infezione da *L. infantum* confermata.

Essi sostengono che la leishmaniosi canina è una malattia in cui l'infezione non è uguale a malattia clinica a causa della elevata prevalenza di infezione subclinica (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Baneth *et al.*, 2008), infatti esistono cani asintomatici con un livello di parassitosi molto elevato e, viceversa, soggetti con gravi manifestazioni cliniche ma con una parassitosi più modesta.

In regioni endemiche il 5-10% dei cani è malato e circa il 90-95% clinicamente sano. Questi ultimi possono essere non infetti ed infetti, e a sua volta infetti resistenti o che svilupperanno la malattia (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Secondo Alvar *et al.*, 2008 l'infezione subclinica non è necessariamente permanente e fattori quali immunosoppressione e malattie concomitanti potrebbero inclinare l'equilibrio e portare alla progressione della malattia clinica nei cani, come è stato osservato nell'uomo nei casi di coinfezione virus dell'immunodeficienza umana e *Leishmania*.

Come accennato nei paragrafi precedenti i meccanismi responsabili della resistenza o suscettibilità risentono di fattori tra cui, l'età, il sesso, l'alimentazione, la genetica dell'ospite, co-infezioni e/o patologie concomitanti, le condizioni di immunosoppressione, risposta immunitaria e profilo delle citochine, virulenza del ceppo di *Leishmania*, precedenti infezioni e modalità di trasmissione.

Le principali manifestazioni cliniche, dopo un esame fisico, nella classica leishmaniosi canina comprendono lesioni cutanee, linfadenomegalia generalizzata, perdita di peso progressiva, atrofia muscolare, intolleranza all'esercizio, diminuzione dell'appetito da lieve a marcato, letargia, splenomegalia, poliuria e polidipsia, lesioni oculari, epistassi, zoppia, vomito e diarrea (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Baneth *et al.*, 2008).

In **Tabella 5**, sono mostrate le percentuali dei risultati clinici nei cani con leishmaniosi canina sintomatica.

Clinical examination finding	Percentage of symptomatic dogs
Skin disease	81%–89%
Enlargement of lymph nodes	62%–90%
Eye disease	16%–81%
Pallor of mucous membranes	58%
Enlarged spleen	10%–53%
Cachexia	10%–48%
Fever	4%–36%
Nose bleeding (epistaxis)	6%–10%
Abnormal nails (onychogryposis)	20%–31%

Baneth *et al.*, 2008. Trends Parasitol

**Tabella 5:** manifestazioni cliniche e risultati percentuali del loro riscontro in cani sintomatici.

Possono essere presenti vari tipi di lesioni cutanee, che rappresentano le manifestazioni più comuni della malattia. La sintomatologia cutanea nel cane è differente da quella nell'uomo in cui si osservano infiammazioni localizzate (Ferrer 1989; Ferrer *et al.*, 1988). E' presente, frequentemente, l'interessamento del sistema reticolo-endoteliale con coinvolgimento di linfonodi, fegato, milza e midollo osseo. La linfadenomegalia può essere sistemica oppure localizzata. Alla palpazione i linfonodi si presentano aumentati di volume, non dolenti, di consistenza duro elastica, di aspetto iperplastico o perfino fibrosi al taglio. L'esame istologico ha aspetti di diffusa proliferazione reticolo-istocitaria associata ad infiltrazione plasmacellulare e i macrofagi appaiono numerosi ed infarciti di leishmanie.

I sintomi classici includono (Ferrer *et al.*, 1988; Koutinas *et al.*, 1992): dermatite secca esfoliativa (cosiddetta furfuracea o amiantacea), non pruriginosa, con o senza alopecia, che può essere generalizzata o localizzata e che di solito ha inizio a livello della testa (naso, orbite oculari, orecchie) e si estende poi al resto del corpo (Alvar *et al.*, 2004), dermatite ulcerosa localizzate a livello delle prominenze ossee, delle giunzioni mucocutanee, padiglioni auricolari, dermatite nodulare focale o multifocale, dermatite proliferativa mucocutanea e dermatite papulare (Ordeix *et al.*, 2005; Bottero *et al.*, 2006).

Poco frequentemente possono presentarsi delle manifestazioni cutanee atipiche (Blavier *et al.*, 2001). All'esame della cute è possibile osservare la presenza di noduli o ispessimenti non ulcerati e non dolenti, di vario diametro, riferibili ad una reazione infiammatoria granulomatosa, il cui esame citologico mostra numerosi macrofagi parassitati.

Sono frequenti sintomi oculari, e le manifestazioni più comuni sono congiuntiviti mucose o mucopurulenti, blefarite (esfoliativa, ulcerosa, o nodulare), uveite anteriore e cheratocongiuntivite, sia comuni che non (Koutinas *et al.*, 1999).

Il coinvolgimento renale può progredire da una proteinuria lieve ad una sindrome nefrosica o a insufficienza renale terminale (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Poiché la leishmaniosi canina è associata ad un'elevata prevalenza di insufficienza renale cronica (IRC) (Costa *et al.*, 2003) che è una manifestazione severa che può portare il soggetto a morte, una diagnosi precoce di malattia renale è rilevante. Così, in cani malati, è essenziale effettuare una valutazione della funzione renale e ricorrere alle raccomandazioni dell'IRIS, società internazionale di interesse renale, per comprendere la progressione della possibile malattia (IRIS, 2006).

I medici veterinari dovrebbero sospettare la possibilità di leishmaniosi canina quando il cane presenta persistente proteinuria renale (creatinina urinaria di proteine rapporto (UPC), 0.5) o azotemia renale (IRIS stadi II, III o IV del CRF) (IRIS, 2006), anemia non rigenerativa (malattie croniche e/o CRF), leucocitosi o leucopenia, iperproteinemia sierosa, beta policlonali e iperglobulinemia riduzione del rapporto albumina/globulina e aumento degli enzimi epatici (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999) (Petanides *et al.*, 2008), trombocitopenia, compromissione dell'emostasi e della fibrinolisi secondaria (Ciaramella *et al.*, 2005).

La glomerulonefrite, associata alla deposizione glomerulare di immunocomplessi, principalmente membranoproliferativa e/o mesangioproliferativa (Plevraki *et al.*, 2006) e la nefrite tubulointerstiziale sono manifestazioni molto comuni a differenza dell'amiloidosi.

Altre manifestazioni cliniche includono: secrezioni nasali mucopurulente, epistassi, atrofia muscolare, onicogrifosi, tremori, deficit motorio, artriti, zoppia, osteomieliti ed artrosinoviti.

Forme cliniche non comuni (Blavier *et al.*, 2001) comprendono: lesioni delle mucose (cavità orale, della lingua e gli organi genitali), gonfiore alle articolazioni con poliartrite erosiva o non erosiva e lesioni ossee osteolitiche osteoproliferative, epatite cronica (Rallis *et al.*, 2005), colite cronica recidivante (Adamama-Moraitou *et al.*, 2007), malattia neurologica a causa della meningite e muscolo massetere miosite atrofica o polimiosite (Vamvakidis *et al.*, 2000), malattie autoimmuni e disturbi cardiovascolari, come la pericardite, vasculite sistemica, tromboembolia e sindrome da iperviscosità di siero.

Nella fase finale della malattia, che può variare da due o tre mesi fino ad anni dopo l'infezione, si osserva il coinvolgimento della maggior parte degli organi e la presenza di ulcere estese. I cani, infine, diventano cachettici e la morte sopraggiunge in seguito ad insufficienza renale o epatica (Alvar *et al.*, 2004).

In questa fase, possono comparire anche infezioni opportunistiche (Ferrer, 1989).

E' importante durante la diagnosi clinica di leishmaniosi effettuare una diagnosi differenziata per altre affezioni (Rickettsiosi, linfoma, dermatiti parassitarie ed allergiche, etc.) ed in ogni caso avvalersi della conferma definitiva tramite esami di laboratorio.

## 6-Aspetti diagnostici

E' importante che la diagnosi clinica indirizzi verso un quesito diagnostico ben preciso. Molti dei segni clinici rilevabili in corso di leishmaniosi, sia animale che umana non sono caratteristici o patognomonicici e questo fa sì che il clinico deve ricorrere ad esami specifici per diagnosticarla o escluderla.

In particolare, la leishmaniosi canina viene sospettata in presenza di rilievi anamnestici (dimagrimento), fisici (dermatopatia furfuracea, linfadenomegalia) e clinici (iperglobulinemia, ipoalbuminemia e proteinuria).

Un contributo, soprattutto nel caso di sintomi non chiari, è dato anche dalla valutazione ed interpretazione degli esami aspecifici ed immunologici.

Questi esami sono di ausilio soprattutto alla valutazione dello stato di salute generale del soggetto. Il rischio in cui si può incorre è non diagnosticare una grande parte dei casi realmente infetti.

La diagnosi di leishmaniosi canina è relativamente facile nei cani con malattia sintomatica, per la quale un test con alta specificità è sufficiente. Essa può essere più difficile in cani asintomatici o in animali con pochi segni clinici di malattia. In questi casi è richiesto un test ad alta sensibilità, il cui ruolo risulta essenziale al fine di emettere correttamente la diagnosi sia in soggetti sintomatici che asintomatici. Il valore di ogni test diagnostico varia a seconda delle ragioni per cui si richiede l'esame e dell'uso che se ne vuole fare: confermare la malattia in cani con segni clinici, verificare l'infezione in cani che hanno contatto con i casi clinici, screening di cani prima dell'entrata in paesi non endemici o screening per eliminare cani infetti da parte della popolazione serbatoio.

Gli esami di laboratorio specifici contribuiscono ad aggiungere un elemento di giudizio valido oltre che rappresentare un utile strumento sia per valutazioni diagnostiche, prognostiche e di monitoraggio dell'andamento della malattia in corso di trattamento farmacologico.

Nuovi approcci si vanno sviluppando al fine di provvedere all'uso di test diagnostici ottimali per i vari campi di studio. Negli ultimi anni nuovi strumenti sono stati messi in campo soprattutto nello sviluppo di metodologie molecolari.

## - *Esami di laboratorio*

Gli esami di laboratorio sono di fondamentale importanza al fine di emettere correttamente la diagnosi, ma anche a fini prognostici e come monitoraggio durante la terapia .

Classificazione degli esami di laboratorio:

- **Esami aspecifici:**

- Esame emocromocitometrico

- Protidemia totale e frazionata

- Uremia e creatininemia;

- Enzimi epatospecifici (ALT, AST, ALP [fosfatasi alcalina]);

- VES

- Esame delle urine;

- Test di immunologia clinica (soprattutto per i fenomeni autoimmuni: latex test, test di Coombs, ENA-test).

- **Esami specifici:**

- Metodi parassitologici

- Tecniche dirette:

- Strisci di materiale opportunamente colorato onde evidenziare gli amastigoti;

- Esami colturali (isolamento delle leishmanie: promastigoti)

- Sierologici (tecniche indirette):

- IFAT (IFI)

- ELISA

- Dot ELISA

- IHAT (emoagglutinazione indiretta)

- CIEP (controimmunolettroforesi o elettrosineresi)

- Fissazione del Complemento

- WB

- Molecolari (tecniche dirette)

- PCR

Gli esami aspecifici, sono elementi utili e necessari al fine di rilevare segni di sofferenza d'organo o di apparato che possano correlare, direttamente o indirettamente, con la patologia in esame. Alla valutazione delle condizioni generali del soggetto in esame si devono prendere in considerazione sia la determinazione di parametri ematologici ed biochimici sia metodi specifici, che permettano di completare il quadro clinico-diagnostico. In particolare gli esami adoperati sono: la Velocità di eritrosedimentazione(VES), il tracciato delle proteine, l'esame emocromocitometrico, la protidemia totale e frazionata, l'esame urine e, quando è necessario, gli enzimi epatospecifici.

Gli esami specifici utili a diagnosticare la malattia in soggetti sospetti da leishmaniosi, possono essere: metodi diretti, il cui scopo è quello di individuare e tipizzare il parassita e metodi indiretti finalizzati a valutare la risposta immunitaria del soggetto infetto.

### *Esami aspecifici:*

Proteine totali ed elettroforesi del siero:

La misurazione quantitativa e qualitativa della protidemia: dosaggio della protidemia totale (PT), rapporto albumina/globulina (A/G) ed elettroforesi delle proteine sieriche (protidogramma) può dare delle indicazioni utili.

E' stato osservato che, in cani malati, la protidemia totale aumenta, si ha una variazione del rapporto A/G (diminuzione dell'albumina e ad un aumento delle b e g-globuline, talvolta anche delle a 2-globuline) che risulta inferiore alla norma (Reis et al., 2006).

L'iper-b-globulinemia è legata, alla migrazione in questa banda elettroforetica di alcune immunoglobuline (IgM, IgA), del fattore C3 del complemento, del fibrinogeno e della transferrina. L'iper-g-globulinemia è il frutto dell'attivazione policlonale dei linfociti B, che producono quantità abnormi di immunoglobuline per lo più aspecifiche. La fusione delle b e g-globuline in un picco policlonale indica una produzione eterogenea di immunoglobuline aspecifiche.

L'ipoalbuminemia è conseguente alla nefropatia, ai processi flogistici ed alla diminuita sintesi epatica che accompagnano e spesso caratterizzano il quadro sintomatologico della leishmaniosi.

Aptoglobulina, a-2-macroglobulina e ceruloplasmina possono avere valore prognostico nella diagnosi di leishmaniosi visto che il loro livello risulta sempre più elevato rispetto ai soggetti non infetti.

Esame emocromocitometrico:

L'anemia, frequente nei soggetti con leishmaniosi è, spesso, di tipo normocitico/normocromico e scarsamente rigenerativa. Nelle cellule bianche del sangue vi è, per meccanismi multifattoriali, una leucopenia con moderata o accentuata linfopenia (Abranches et al., 1991).

Velocità di eritro-sedimentazione (VES):

Nei cani affetti da leishmaniosi, è in costante aumento a causa di vari fattori che contribuiscono all'aggregazione e alla formazione di rouleaux eritrocitari, con dimensioni e peso superiore alle singole emazie, e per questo con velocità maggiore di precipitazione nel plasma.

Enzimi epatospecifici:

L'aumento nel circolo ematico degli enzimi transaminasi glutammico piruvica (ALT) e/o fosfatasi alcalina (ALP) segna il coinvolgimento epatico che può essere presente in soggetti in fase di leishmaniosi, in quanto uno degli organi bersaglio.

Urea e creatinina:

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 indiscutibile valore prognostico.

Esame delle urine:

Utile ai fini della valutazione della proteinuria che è un segno precoce di glomerulopatia. E' proporzionale al danno renale. Si può rilevare prima dell'innalzamento dei valori della creatinina e dell'urea, e può essere associato o meno alle alterazioni dell'esame del sedimento urinario. La tipizzazione delle proteinurie permette di valutare e correlare il tipo di danno prevalentemente glomerulare o tubulare al tipo di proteine escrete, ad alto peso molecolare il primo danno e a basso peso molecolare il secondo danno. La proteinuria è di tipo misto quindi glomerulare e tubulare quando il danno renale è grave, mentre è di tipo selettivo se la compromissione renale è meno significativa.

### *Esami specifici:*

Consentono di diagnosticare la presenza dell'agente eziologico in maniera diretta e/o indiretta. Di seguito si riportano alcuni tipi di esami:

#### *Metodi Diretti*

##### - Metodi parassitologici

Comprendono tutte quelle metodiche atte a mettere in evidenza il parassita, nella forma di amastigote, in organi e tessuti.

La diagnosi di leishmaniosi è basata sull'identificazione diretta degli amastigoti, liberi o all'interno del citoplasma dei macrofagi, può essere effettuata a partire da *preparati, su vetrino*, ottenuti da sangue, raschiato cutaneo<sup>7</sup>, agoaspirato linfonodale (in genere linfonodi prescapolari e poplitei), splenico, midollare, epatico,(Gomes *et al.*, 2008). Il campione, opportunamente preparato, è colorato con vari metodi, la colorazione May-Grunwald-Giemsa, Wright e di Leishman (Herwaldt, 1999), ed esaminato al microscopio.

Importante e da non sottovalutare è la scelta del campione biotico<sup>8</sup> da analizzare: l'aspirato midollare è certamente il più comune, l'aspirato splenico è il più sensibile ma sconsigliato per il rischio di complicazioni emorragiche, l'aspirato linfonodale è utile solo in presenza di una linfadenopatia, evenienza molto frequente nei cani, la biopsia epatica non è usata frequentemente. Il sangue periferico per quanto è un esame non invasivo, risulta essere meno sensibile, anche se Liarte *et al.*, 2001, attraverso l'uso di tecniche di concentrazione hanno dimostrato, sia nel cane che nell'uomo, una sensibilità del 97%.

E' evidente che in caso di leishmaniosi cutanea la scelta del campione biologico è più rivolta all'individuazione parassitologica da materiale proveniente dalla lesione stessa, essendo spesso sito primario e localizzato.

In infezioni asintomatiche la sensibilità della tecnica può risultare bassa (<30%) (Saridomichelakis, M.N. *et al.*, 2005), così, l'esame microscopico può non risultare risolutivo probabilmente perché il numero di protozoi risulta scarso.

---

7 Materiale cutaneo ottenuto da: raschiamento superficiale del derma con opportuno "scarificatore", ago-aspirato cutaneo; Punch biopsy. Il sito di prelevamento rappresenta il fattore determinante nel reperimento del parassita e dipende dal tipo di lesione cutanea. Usualmente la zona marginale infiammata della lesione è il posto di elezione per l'isolamento del parassita.

8 Prelievi biotici possono altresì essere effettuati a livello cutaneo, asportando una piccola porzione di cute, tagliando nello spessore del derma, per poi effettuare diverse impressioni del campione ottenuto su un vetrino portaoggetti. Altri campioni possono essere ottenuti sia per impressione che per raschiamento da ulcere o granulomi.

L'esame istopatologico dei tessuti con l'uso dell'immunoistochimica è utile per aumentare la sensibilità di rilevazione, in presenza di una bassa carica del parassita.

Possono esserci casi che danno esito negativo, pur in presenza di sospetto clinico molto forte e/o di un reperto sierologico dubbio.

Un altro metodo parassitologico è l'*isolamento colturale*: i campioni prelevati dalle stesse sorgenti sopra citate, possono essere messe in coltura in adatti e specifici terreni di crescita.

I terreni di coltura utilizzati possono essere monofasici come Schneider, M199, RPMI, Grace o difasici come Novy-McNeal-Nicolle, Brain Heart Infusion e Tobie modificato da Evans (EMTM), contenente sangue di coniglio. Il terreno viene inoculato con una o due gocce di aspirato o con un organo/tessuto omogeneizzato e incubato ad una temperatura tra i 22° e 26°C. Le culture sono osservate settimanalmente per la presenza di promastigoti. Il protozoo può essere presente nella prima settimana o necessitare di subcolture per essere messo in evidenza. La negatività è refertata dopo 2 mesi.

Non tutti i ceppi di *Leishmania* crescono alla stessa velocità e non tutti i tessuti e gli organi dello stesso cane hanno una carica parassitaria simile.

Midollo osseo, linfonodo e milza sono materiali biologici con un più alto rapporto di positività (Maia e Campino, 2008).

E' importante avere delle precauzioni al fine di non inficiare l'esame e la sensibilità della metodica di analisi, ad es. è importante il tempo che intercorre tra il prelievo e la consegna al laboratorio. Il campione, infatti, deve essere consegnato e seminato preferibilmente entro le 24h e durante il trasporto deve essere mantenuto in apposito terreno (Tobie liquido) ad una temperatura di 4°C, al fine di evitare eventuale moltiplicazione e contaminazione batterica.

Ai fini diagnostici rappresenta il test d'eccellenza (goal standard) e permette la creazione e la conservazione di una Banca di ceppi isolati, utile per studi di tipizzazione, epidemiologia e ricerca.

Tra gli svantaggi abbiamo: la bassa sensibilità se comparata alle tecniche molecolari; la necessità di avere laboratori attrezzati e personale specializzato, in quanto, la metodica è piuttosto laboriosa; i tempi lunghi per l'esito finale; la facile possibilità di contaminazioni o presenza di falsi negativi per campione non idoneo in quantità e qualità.

- Metodi molecolari

Di recente acquisizione, rispetto alle metodiche classiche, sono tra le prove diagnostiche più specifiche e sensibili. Le metodiche di biologia molecolare ed in particolare la

*Polymerase Chain Reaction*, PCR<sup>9</sup>, mettono in evidenza, tramite amplificazione in vitro, la presenza di un segmento specifico di DNA (Mullis e Faloona, 1987) del parassita, nel campione in esame.

In genere, la reazione di PCR ha diverse variabili da mettere a punto affinché la metodica sia standardizzata e validata per l'identificazione del patogeno. Risulta molto importante, ai fini della sensibilità e specificità, la scelta del frammento di DNA specifico del parassita da analizzare. Per quanto concerne la *Leishmania spp.* esistono molti protocolli del metodo di PCR in cui il frammento di DNA appartiene a regioni semi-conservate o conservate come il DNA dell'operone ribosomiale ITS-1, la piccola subunità (SSU) del gene rRNA, il DNA minicircolo del Kinetoplasto<sup>10</sup> (kDNA).

La PCR ed i metodi derivati, si sono rivelati efficaci in svariati campi della diagnostica e non solo. Rappresentano un utile strumento per classificare i diversi microrganismi, individuare ceppi più o meno virulenti o resistenti a trattamenti farmacologici, effettuare indagini di epidemiologia molecolare, monitorare la malattia, prevedere le ricadute, ecc...

Nel caso particolare della *Leishmania spp.*, la caratterizzazione o tipizzazione molecolare può offrire nuove possibilità sia dal punto di vista della classificazione delle varie specie, le altre metodiche risultano molto elaborate e complesse, sia per una conoscenza più approfondita dei ceppi circolanti in aree endemiche e non, dei meccanismi di virulenza e dell'analisi genetica di correlazione, cui si potrebbe fare seguire una migliore azione di controllo, prevenzione e profilassi.

E' una metodica molto versatile anche per la rilevazione di *Leishmania spp.*, in una varietà di campioni clinici (aspirato midollare e linfonodale, sangue, cute, urine, ecc...), da esseri

---

9 Il test molecolare della PCR è una tecnica diagnostica innovativa che si è affermata in questi ultimi anni nei principali centri di analisi e che permette la rilevazione di un frammento specifico dell'acido nucleico (DNA) del parassita, anche in concentrazioni infinitesimali, superando così i limiti di specificità e sensibilità di altri metodi. Alla base vi è un'amplificazione esponenziale del DNA-*target* che caratterizza ed identifica il microrganismo in esame. La specificità è garantita dall'uso di *primers* specifici che si legano a porzioni definite e precise del genoma o materiale genetico della specie in esame, permettendone l'amplificazione e quindi la rilevazione esclusiva del DNA-*target*. Alla fine la reazione, nella versione standard della metodica, viene visualizzata attraverso una corsa elettroforetica su gel d'agarosio in cui è presente l'etidio bromuro, intercalante aspecifico del DNA che rende visibile il frammento di DNA amplificato, quando è esposto ai raggi UV.

10 La *Leishmania spp.*, come altri kinetoplastidi, contengono, nel mitocondrio, una complessa rete di molecole concatenate di DNA circolare, chiamato DNA del cinetoplasto o kDNA. Il DNA mitocondriale rappresenta circa il 20% del DNA totale cellulare ed è organizzato in una rete, dove si ritrovano migliaia di piccoli minicircoli. Esistono all'interno di questo DNA regioni conservate, altamente conservate, e meno conservate, esse possono essere utilizzate come bersagli per reazioni di PCR utili alla discriminazione di gruppi di *Leishmania spp.* (Gomes et al., 2008). Questo spiega perché i protocolli di PCR che adoperano come frammento una sequenza del kDNA si sono dimostrati più sensibili per il rilevamento della *Leishmania* soprattutto nel sangue canino. Lachaud, L. et al. (2002) Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. 40, 210-215.

umani (Piarroux *et al.*, 1994.), cani (Degraeve *et al.*, 1994. Lachaud *et al.*, 2002;. Strauss-Ayali *et al.*, 2004.) e volpi (Silva *et al.*, 2000).

Il metodo è sensibile sia su materiale fresco che fissato in formalina o incluso in paraffina (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Roura *et al.*, 1999; Lachaud *et al.*, 2002).

La PCR “*end point*”, è il metodo più semplice, che esprime in termini qualitativi la presenza/assenza del DNA del protozoo. Il risultato non ci permette di stabilire la quantità del materiale genetico del parassita presente nel campione in origine e nulla ci dice sullo stato del protozoo stesso (distinzione tra parassita “vivo” o “morto”). Sono necessarie opportune precauzioni al fine di evitare la presenza di falsi positivi dovuti a contaminazioni crociate che si potrebbero verificare durante la fase di prelievo o durante l'esecuzione dell'esame. Negli anni tale metodica standard è stata adeguata e modificata alle varie esigenze diagnostiche attraverso la messa a punto di tecniche quali, PCR nested, competitiva, PCR real time, ecc... Tali tecniche sono riuscite a superare varie problematiche, raggiungendo un'efficacia di diagnosi molto elevata.

#### *PCR quantitativa Real-Time.*

Grazie all'uso integrato di tecnologie informatiche, strumentazioni sempre più precise ed accurate, le metodiche di biologia molecolare hanno raggiunto un grado di sviluppo eccezionale, consentendo un livello di sensibilità in grado di rivelare anche una sola copia di genoma (rappresenta una cellula di parassita) nel campione in esame. La PCR è una tecnica molecolare che consente, mediante cicli ripetuti a differenti temperature, di replicare e amplificare, e quindi di evidenziare, una regione specifica di DNA del microrganismo in esame, attraverso l'uso di primers complementari alla sequenza delle estremità della regione bersaglio. La miscela di reazione, contenente il campione di DNA da amplificare, i primers specifici, i desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP), una DNA polimerasi termostabile (Taq DNA polimerasi) e un tampone adatto all'enzima, è sottoposta al processo che avviene per mezzo di un termociclatore automatizzato.

La PCR si articola in tre fasi: denaturazione, appaiamento (annealing) ed estensione o sintesi (figura 9). Durante la prima fase, il DNA bersaglio a doppio filamento viene denaturato mediante riscaldamento a temperatura di circa 94-95°C, rendendo così accessibile la specifica regione da amplificare (target).

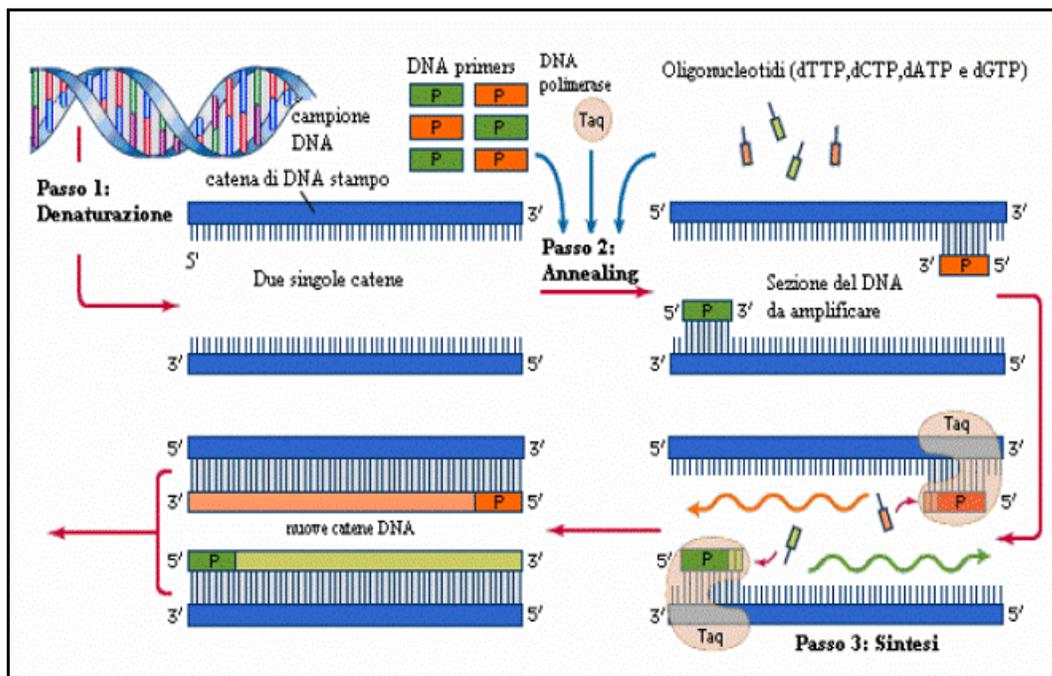


Figura 9: Ciclo di PCR

In seguito, la temperatura viene abbassata a valori compresi tra 50 e 60°C per consentire l'appaiamento degli oligonucleotidi specifici (primers) alla sequenza di DNA ad essi complementare (fase di "annealing"). In questo modo, gli estremi 5' degli oligonucleotidi segnano su ciascun filamento gli estremi del frammento che viene amplificato e i loro estremi 3' offrono alla DNA polimerasi il gruppo idrossilico di innesco alla reazione. Questa progredisce contemporaneamente su entrambi i filamenti e in direzioni antiparallele per estensione dei primers con i nucleotidi trifosfati presenti nella miscela di reazione, ad una temperatura di 72°C

Alla fine del primo ciclo, il frammento bersaglio è stato duplicato e durante i successivi cicli di denaturazione, appaiamento ed estensione, tutti i nuovi filamenti servono da stampo, cosicché la quantità di DNA prodotta aumenta in maniera esponenziale. Il risultato finale è un'amplificazione selettiva del DNA target, fiancheggiato dai primers.

Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 20-30 volte. Poiché ogni ciclo della reazione dura solo pochi minuti, nel giro di qualche ora si possono produrre notevolissime quantità di DNA target, anche a partire da campioni biologici contenenti un numero esiguo di molecole bersaglio.

Nella diagnosi della leishmaniosi canina la PCR può essere eseguita su sangue intero, midollo osseo, linfonodo o altri tessuti biotici.

In genere, questa tecnica rileva, in maniera più attendibile e con maggiore precisione, gli stadi precoci della malattia, e quindi anche i casi transitori e autolimitanti, cioè quei cani che in qualche modo risolvono l'infezione (Gradoni, 2002). Essa risulta più sensibile dell'osservazione diretta (strisci e colture) e della sierologia ed inoltre, è utile anche per monitorare il decorso della malattia durante e dopo il trattamento antiparassitario e per classificare le diverse specie di *Leishmania* mediante l'impiego di primers specie-specifici (Roura, 2001).

La tecnica della PCR, pur essendo molto sensibile, non consente la quantificazione del DNA bersaglio di partenza. Tale scopo è stato raggiunto con l'impiego della real-time PCR. La quantificazione degli acidi nucleici è estremamente importante per stabilire il grado di attività di un'infezione, per monitorare l'evoluzione della malattia, per differenziare un'infezione attiva da una persistente, per studiare le interazioni tra microrganismo-ospite, per monitorare l'efficacia o meno di una terapia.

Con la real-time PCR non sono richieste manipolazioni post amplificazione e questo comporta la diminuzione dei tempi di ottenimento dei risultati, ed introduce la possibilità di monitorare in tempo reale l'andamento della reazione.

La real-time PCR si basa su una quantificazione che avviene durante la fase esponenziale della reazione a differenza di tecniche di PCR convenzionale che utilizzano una quantificazione all'end point ovvero alla fine della reazione di amplificazione mediante elettroforesi su gel di agarosio. La real-time PCR utilizza particolari combinazioni di coloranti fluorescenti la cui fluorescenza viene smascherata quando la catena di DNA viene sintetizzata oppure fluorocromi che si legano alla catena nascente durante la reazione di amplificazione. La fluorescenza emessa in seguito ad uno specifico irraggiamento da parte della sorgente luminosa del termociclatore viene quindi misurata in tempo reale da una camera CCD. Tutte le operazioni relative alle misurazioni avvengono sotto il controllo di un software gestito da un personal computer.

Sono state messe a punto differenti chimiche che consentono di rilevare in modo specifico gli ampliconi; una di esse, la chimica del SYBR Green, consiste nell'utilizzo di un colorante fluorescente che si lega al solco minore del DNA a doppia elica, quindi durante la fase di annealing della reazione. L'aumento di fluorescenza corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone. Il legame del SYBR Green non dipende da una particolare sequenza nucleotidica; infatti, la specificità della reazione è data solo dalla specificità della

coppia di primers utilizzati per il gene target. L'uso di fluorocromi che legano il DNA a doppio filamento per la rilevazione "real-time" dei prodotti PCR possiede sia vantaggi che svantaggi. Il vantaggio maggiore è la versatilità, in quanto SYBR Green può essere utilizzato per monitorare l'amplificazione di qualsiasi sequenza di DNA a doppia elica e poi non è richiesta una sonda che aumenta i costi della reazione. Lo svantaggio è che può generare falsi positivi dato che non è specifico per una particolare sequenza nucleotidica; la specificità del SYBR Green però può essere controllata mediante l'analisi delle curve di Melting.

Una seconda chimica, dotata di maggiore specificità è quella che utilizza sonde TaqMan; tale saggio si basa sulla presenza nella tradizionale miscela di reazione della PCR di un oligonucleotide, una sonda non estendibile fluorogenetica, che ibrida specificamente una regione del DNA bersaglio compresa tra i due primers.

Il metodo TaqMan si basa su due principi:

Attività 5'- esonucleasica della Taq polimerasi che agisce sulla superficie dello stampo per rimuovere ostacoli a valle dell'amplificazione.

Tecnologia FRET (Fluorescent Resonant Energy Transfer) il cui principio è che, se un colorante ad alta energia (reporter) è nelle vicinanze di un colorante a bassa energia (quencher), ci sarà un trasferimento di energia da quello alto a quello basso. Il reporter quindi non emetterà fluorescenza.

La sonda TaqMan, specifica per il gene target di interesse, è marcata con due molecole fluorescenti: il reporter, una fluoresceina modificata posta al 5' e il quencher, una rodamina modificata posta al 3'. Quando la sonda è intatta, la vicinanza del quencher con il reporter riduce la fluorescenza del reporter mediante FRET.

Durante la PCR, se la sequenza bersaglio è presente, la sonda si lega al target che si trova tra i due primers "forward" e "reverse". L'attività esonucleasica 5'- 3' della Taq DNA polimerasi degrada la sonda ibridizzata e separa i due fluorocromi, permettendo al reporter di emettere un segnale fluorescente che può essere rilevato con una camera CCD. Poiché viene liberata una molecola di reporter per ogni copia di DNA duplicata durante la PCR, la fluorescenza che si accumula è proporzionale, in ogni momento, alla quantità del prodotto di PCR specifico (figura 10 ).

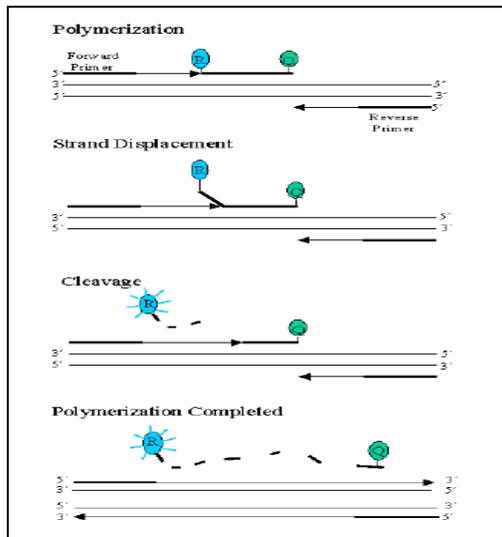


Figura 10: Rappresentazione della reazione TaqMan.

La fluorescenza viene seguita in tempo reale utilizzando un termociclatore dotato di un opportuno dispositivo fluorimetrico.

I vantaggi delle sonde TaqMan sono:

- Ibridazione specifica tra la sonda e il target per dare il segnale fluorescente.
- Le sonde possono essere marcate con fluorocromi differenti e quindi si possono amplificare due target differenti nella stessa reazione.
- Le rielaborazioni post-PCR vengono eliminate.

Lo svantaggio principale invece è che si devono sintetizzare sonde differenti per differenti target quindi con costi notevoli. L'emissione della fluorescenza viene letta dall'apparecchio durante la reazione di PCR, in tempo reale da una camera CCD e un software costruisce un grafico utilizzando i dati di fluorescenza emessa durante l'amplificazione. Il grafico di una reazione di real-time PCR è definito "amplification plot" e contiene varie informazioni che occorrono per la quantizzazione del DNA o RNA (figura 11).

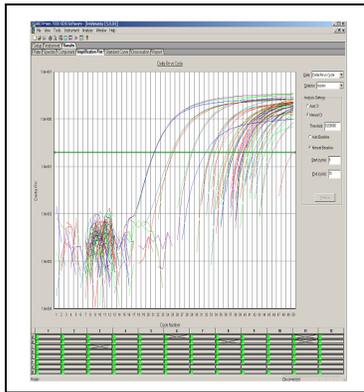


Figura 11: Plot di amplificazione della real-time PCR

La linea “Threshold” (soglia) è il livello di rivelazione o il punto in cui una reazione da un segnale di fluorescenza superiore al segnale di fondo. Questa linea si riferisce alla fase esponenziale della reazione per dare una misura precisa ed accurata. La scelta della soglia è arbitraria e si basa sulla variabilità della linea di base.

Cycle Threshold, Ct (ciclo soglia) è il ciclo in corrispondenza del quale il software Sequenze Detection System (SDS) comincia a rilevare l’incremento del segnale associato con una crescita esponenziale del prodotto di PCR. Il Ct è inversamente proporzionale alla quantità iniziale di DNA o CDNA target cioè alla concentrazione del campione (figura 12 ).

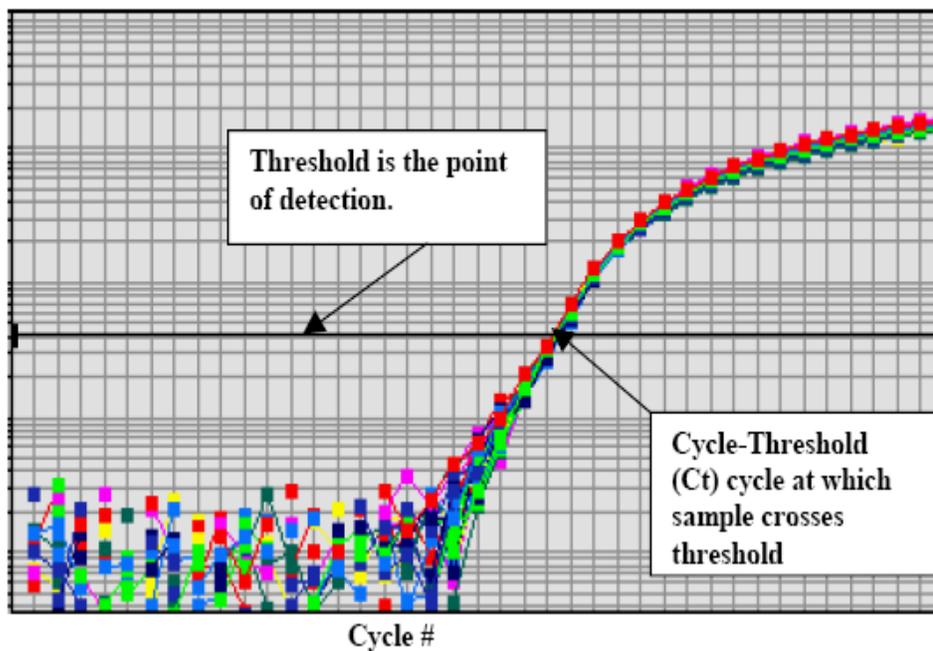


Figura 12 . Rappresentazione del Cycle-Threshold.

I prodotti della PCR durante la reazione aumentano logaritmicamente solo nei primi cicli (tra il 20° e il 25°) per poi arrivare al plateau intorno al 40° ciclo.

La quantizzazione mediante real-time PCR può essere assoluta o relativa.

Nella quantizzazione assoluta il campione che si deve stimare viene confrontato con una curva standard, una soluzione del gene target con concentrazione nota espressa in numero di copie (lo standard). La concentrazione dello standard, RNA o DNA, può essere misurata con lo spettrofotometro e convertita in numero di copie utilizzando il peso molecolare del DNA e dell' RNA. Lo standard può essere DNA plasmidico a doppia elica, RNA trascritto in vitro, DNA a singola elica sintetizzato in vitro, cDNA che esprime il gene target. Per costruire la curva standard si utilizzano diverse diluizioni del campione a concentrazione nota (almeno 5) e ogni punto della curva va testato in triplicato. Il risultato finale sarà quindi la concentrazione del campione da testare espressa in numero di copie del gene target.

Nella quantizzazione relativa non si utilizza una curva standard e i risultati si calcolano comparando i valori di Ct (metodo comparativo del Ct) del campione rispetto al gene di riferimento (housekeeping) e al calibratore. Nel metodo comparativo del Ct, i livelli di espressione genica sono relativi ad un gene di riferimento detto "housekeeping gene" e paragonati ad un calibratore. Il perfetto controllo endogeno riflette la quantità di cDNA per campione e ha un livello di espressione costante in tutti i campioni in esame. Esso è utile per normalizzare errori riguardanti le concentrazioni di RNA e le variazioni di efficienza della retrotrascrizione. I geni housekeeping più utilizzati sono: la  $\beta$ -actina, GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato), rRNA (RNA ribosomiale), ATP sintetasi 6 mitocondriale.

La quantità di DNA target, normalizzata con il controllo endogeno e il calibratore, è data dalla formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , dove  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (campione) -  $\Delta Ct$  (calibratore) e  $\Delta Ct$  è il Ct target sottratto del Ct del controllo endogeno. Ossia :

$$1. Ct \text{ campione} - Ct \text{ controllo endogeno} = \Delta Ct \text{ (campione)}$$

$$Ct \text{ calibratore} - Ct \text{ controllo endogeno} = \Delta Ct \text{ (calibratore)}$$

$$2. \Delta Ct \text{ (campione)} - \Delta Ct \text{ (calibratore)} = \Delta\Delta Ct$$

Questa formula è applicabile quando l'efficienza della PCR del campione è simile quella dell'housekeeping gene. Se le efficienze non sono simili allora si deve utilizzare un altro metodo ad esempio la curva standard o si può scegliere un altro housekeeping.

### *Metodi indiretti*

#### - Metodi immunologici

Sono tutte quelle tecniche che danno una risposta diagnostica indiretta sulla presenza del microrganismo all'interno di un soggetto. Le metodiche si basano sulla ricerca di anticorpi specifici, in questo caso, anti-*leishmania* su emosiero. In particolare, si cercano le immunoglobuline di classe G, dato il lungo periodo di incubazione della malattia. La sensibilità di questa metodica è molto bassa negli immunodepressi per la loro scarsa risposta anticorpale.

Le principali tecniche sierologiche adoperate hanno varie formulazioni: Immuno fluorescenza indiretta, IFAT; saggio immunoenzimatico, ELISA (Dot ELISA, K39-ELISA); emoagglutinazione indiretta o diretta, (DAT); Western blot (di scarsa praticità per saggiare un elevato numero di campioni); fissazione del complemento (Alvar et al., 2004).

Una problematica dei test sierologici, in particolare quelli che adoperano antigeni di *Leishmania* "crudi", è la presenza di falsa positività dovuta ad una cross-reattività con altri agenti patogeni. Questo è stato evidenziato soprattutto in Centro e Sud America, zone in cui sono presenti infezioni con il *Trypanosoma cruzi* (Porrozzi et al., 2007).

In letteratura sono riportati casi di cross-reattività in cani affetti da Ehrlichiosi, Rickettiosi, Toxoplasmosi.

Al fine di superare queste difficoltà si sono messe a punto metodiche sierologiche che fanno uso di proteine ricombinanti contenenti specifici epitopi (K39, K9, K26, ecc...) (Scalone et al., 2002; Boarino et al., 2005).

In genere, per quanto concerne la specie canina, elevati livelli di anticorpi sono associati con elevato parassitismo e malattia (Reis et al., 2006).

Deve essere comunque sottolineato che non c'è una proporzionalità diretta tra titolo sierologico e gravità della malattia. Risulta pertanto di scarso significato la valutazione del titolo anticorpale, come marcatore nel monitoraggio della terapia.

Alcuni cani rimangono sieronegativi per periodi variabili dopo l'infezione con *Leishmania* (Strauss-Ayali et al., 2004).

Un animale con infezione da *Leishmania* può risultare negativo o debolmente positivo sia nelle fasi iniziali dell'infezione, in cui può apparire anche del tutto asintomatico, sia nelle fasi più evolute, in seguito all'instaurarsi di meccanismi di immunosoppressione.

Un'altra eventualità di frequente riscontro nella pratica è quella dell'animale trattato con cortisonici o con farmaci specifici (antimoniali) che comportano una drastica riduzione del titolo anticorpale (Mancianti *et al.*, 1990).

Quindi, un alto livello di anticorpi è conclusiva di una diagnosi di leishmaniosi canina (Solano-Gallego *et al.*, 2009), mentre, la presenza di livelli bassi di anticorpi non è necessariamente indicativa della malattia e ulteriori approfondimenti, con altri metodi diagnostici, sono necessari per confermare o escludere la leishmaniosi clinica (Miro *et al.*, 2008).

In aree endemiche è consigliabile non adoperarlo come unico test diagnostico, in quanto possono risultare falsamente positivi quei cani resistenti o sani che sono venuti a contatto precedentemente con il parassita, e falsamente negativi soggetti che, infettati di recente, non hanno ancora prodotto una risposta anticorpale rilevabile (Mancianti *et al.*, 1988).

Esistono sul mercato, in Italia o in altri Paesi, kit sierologici commerciali a risposta rapida, che non sono altamente affidabili. Essi hanno un valore puramente indicativo nella pratica clinica veterinaria.

Il test di immunofluorescenza indiretta, l'IFAT<sup>11</sup>, è largamente utilizzato in analisi di routine nell'approccio diagnostico alla leishmaniosi.

Si basa sulla rilevazione di anticorpi IgG specifici anti-*Leishmania* nel siero del paziente.

E' considerato il test di referenza (*gold standard*) utile per *screening* di massa della popolazione, soprattutto canina, e quindi per studi epidemiologici.

I risultati dal test vengono interpretati qualitativamente come negativi, positivi e dubbi<sup>12</sup>.

Per le diverse specie animali esistono, comunque, degli indici di *cut-off* in accordo con il Manuale OIE (Organizzazione Internazionale delle Epizootie) e con l'Istituto Superiore di Sanità.

---

11 Tale analisi si esegue facendo reagire il siero del soggetto in esame, opportunamente diluito, con l'antigene di *Leishmania*, fissato su vetrini, a 37 °C per 30 minuti circa. Dopo lavaggio e eliminazione degli anticorpi superflui, si aggiunge l'antiglobulina specifica coniugata con isotiocianato di fluoresceina. La lettura dei campioni viene effettuata al microscopio a fluorescenza. Si tratta di un esame che può risentire della soggettività dell'operatore che esegue l'esame come pure della qualità dei reagenti, per cui l'esame dovrebbe essere effettuato sempre presso lo stesso laboratorio e, nei casi dubbi, solitamente di fronte a titoli bassi, è consigliabile la ripetizione del test a distanza di 20 - 30 giorni. Per ovviare a questo limite della metodica si effettuano dei ring test intra- e interlaboratorio.

12 Nella titolazione il *cut-off* che distingue il campione positivo dal negativo varia da 1:40 a 1:160 tra differenti laboratori. (Ferroglio and Vitale, 2006) Ferroglio, E., Vitale, F., 2006. Diagnosis of leishmaniosis: between old doubts and new uncertainties. Vet. Res. Commun. 30, 35-38.

Per quanto concerne la specie canina il test ha una specificità del 100% per titoli anticorpali superiori a 1:160, ed una sensibilità che è compresa in un range tra il 98,4% e il 99,5%, pur potendosi riscontrare un 5-6% di falsi negativi. Così, un riscontro sierologico positivo con titolo maggiore/uguale a 1/160 indica sempre infezione in atto ed è da valutare se sottoporre a terapia; mentre titoli, dubbi, compresi fra 1/40 e 1/80, in assenza di sintomi, devono essere considerati “sospetti” ed è consigliabile sia il supporto di una metodica specifica diretta che ricontrollare i valori sierologici con il test IFAT, dopo circa 3-6 mesi.

Nei casi riscontrati di pazienti con malattia e sierologia negativa, la spiegazione può risiedere nella condizione immunologia del singolo individuo. Infatti, deficit immunitari, malattie autoimmuni possono influenzarne il significato.

I test sierologici immunoenzimatici ELISA si basano sull'impiego di 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.

L'antigene è rappresentato o da estratto proteico crudo di *Leishmania* in coltura, o da proteine purificate o ricombinanti. Quest'ultimo tipo, di cui esistono diversi epitopi specifici, è sicuramente più specifico e sensibile rispetto al primo tipo (Gomes *et al.*, 2006).

Il test di intradermoreazione di Montenegro misura l'ipersensibilità ritardata e quindi la risposta cellulo-mediata. Le reazioni intradermiche specifiche sono adoperate per indagare e valutare l'avvenuto contatto, della popolazione sana, con il parassita. Questi test rivelano, in genere, una elevata percentuale di infezioni asintomatiche in aree endemiche. E' un test analogo all'intradermoreazione di Mantoux per la tubercolosi. La reazione indica la presenza di un'immunità di tipo cellulo-mediata nei confronti della *Leishmania* e non necessariamente dell'infezione in atto. Viene impiegata una sospensione di antigeni di promastigoti di *Leishmania* in coltura (inattivata con fenolo) che si inocula, per via intradermica. La reazione si sviluppa e viene letta dopo 48-72 ore. La reazione è positiva se si forma una lesione papulare o nodulare eritematosa. Nell'uomo, contrariamente a quanto avviene con la sierologia, di solito la reazione di Montenegro è più fortemente positiva nelle forme cutanee localizzate e debolmente positiva nelle forme muco-cutanee, mentre è negativa nelle forme cutanee diffuse e nelle viscerali, caratterizzate dalla scarsissima o nulla reazione immunitaria di tipo cellulo-mediata. La reazione può essere negativa anche nelle fasi iniziali della malattia cutanea. Nelle popolazioni delle zone endemiche possono aversi fino al 25% di positività della reazione di Montenegro, per tale motivo in queste zone il test è impiegato praticamente solo per studi epidemiologici. Una reazione di

Montenegro che, da negativa, diventa positiva, è indice di una buona risposta immunitaria al trattamento che evolve verso la guarigione. La sensibilità del metodo può arrivare al 100% ma c'è una cross-reattività tra tutte le specie di *Leishmania*.

## 7- Terapia

Il trattamento della leishmaniosi canina rappresenta ancora un problema irrisolto poiché non esistono tutt'oggi farmaci specifici in grado di determinare l'eliminazione del parassita in seguito alla guarigione clinica.

I farmaci comunemente usati per la terapia anti-Leishmania in medicina veterinaria sono gli stessi utilizzati per la leishmaniosi umana, con modalità e posologia differenti.

I protocolli terapeutici più frequentemente utilizzati prevedono l'impiego di composti antimoniali pentavalenti come l'antimoniato di N-metilglucamina in combinazione con allopurinolo.

L'antimoniato di N-metilglucamina è considerato il farmaco di prima scelta nel trattamento della leishmaniosi canina. Il meccanismo d'azione sembra essere legato alle cellule del sistema reticolo-endoteliale contenenti il parassita fagocitato, con conseguente alterazione del suo metabolismo per inibizione selettiva di alcuni enzimi della glicolisi e della  $\beta$  ossidazione degli acidi grassi (fosfofruttochinasi e deidrogenasi piruvica) con conseguente deplezione dei livelli intracellulari di ATP e GPT. Il farmaco, dunque, esplicherebbe un'azione parassitocida.

Il farmaco non è assorbito per via orale, per cui, la via di somministrazione è quella sottocutanea o intramuscolare. La via endovenosa è da sconsigliare per la ridotta emivita del farmaco. Gli effetti collaterali interessano distretti organici come il cuore, il rene e il fegato e raramente si verificano alterazioni del profilo ematologico rappresentati da leucopenia, grave agranulocitosi e anemia emolitica.

Nel cane si impiega un dosaggio di 100 mg/kg/die somministrato per via sottocutanea o intramuscolare per un periodo di 30 giorni consecutivi, in associazione con allopurinolo (10 mg/kg).

L'allopurinolo è un composto analogo dell'ipoxantina, largamente impiegato nella terapia della gotta dell'uomo per la sua azione di blocco della xantina-ossidasi nella sintesi dell'acido urico. La sua attività contro il parassita dipende dalla incapacità di quest'ultimo di sintetizzare autonomamente le purine con la conseguente necessità di recuperare le basi azotate e i nucleosidi dall'ospite. Pertanto, viene metabolizzato e trasformato dal parassita in un analogo inattivo dell'inosina, nucleoside formato dall'unione di una molecola di

ribosio con una di ipoxantina. Questo analogo, introdotto nell'RNA del patogeno, ne altera la traduzione delle proteine con effetti negativi sull'intero metabolismo del protozoo (Baneth, 2002).

L'allopurinolo è comunemente impiegato per la terapia della leishmaniosi in combinazione con antimoniali pentavalenti poiché, grazie al suo effetto parassitostatico, migliora l'efficacia clinica del trattamento e riduce il tasso di recidiva (Manna, 2008).

Un farmaco di recente introduzione nella terapia della leishmaniosi canina è la miltefosine. La miltefosine, sviluppata inizialmente come farmaco antitumorale, è chimicamente un esadecil-fosfo-colina, cioè un analogo della fosfocolina e come tale in grado di interferire sui segnali metabolici cellulari e sulla permeabilità delle membrane cellulari nonché sulla loro composizione lipidica. Il meccanismo d'azione si esercita colpendo la via del metabolismo dei fosfolipidi del parassita, interferendo con le vie di comunicazione cellulare e inibendo la sintesi della membrana cellulare parassitaria. Le modalità d'azione del farmaco sono rappresentate dall'inibizione della biosintesi dei recettori del GPI (glicosilfosfatidilinositolo), molecola chiave per la sopravvivenza intracellulare degli amastigoti e dall'alterazione del segnale di trasduzione agendo sulle fosfolipasi C e proteichinasi C *Leishmania* specifiche. Ne consegue la morte per apoptosi della cellula protozoaria (Sundar, 2007).

## 8-Parte sperimentale

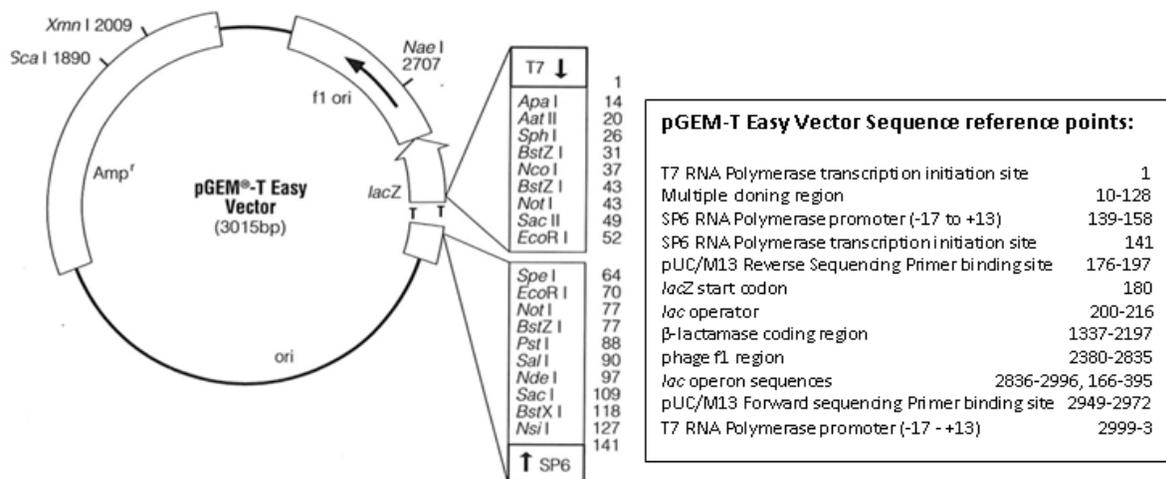
Obiettivo della tesi è stato quello di ottimizzare metodiche molecolari, quali la Real Time PCR, già in uso da alcuni anni nel nostro Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie allo scopo di migliorarne le prestazioni. In particolare mediante la comparazione tra due metodi di “costruzione di una curva standard”:

- 1) Curva standard mediante DNA proveniente da ceppo di *Leishmania infantum* MHOM/IT/80/IPT1.
- 2) Curva standard ottenuta dal DNA plasmidico .

Le *leishmanie* vive, a concentrazione nota, sono state ottenute da una coltura cresciute in Tobie modificato Evan's. E' stata aspirata totalmente la fase liquida del Tobie in cui si trovava la coltura di *Leishmania* da utilizzare è stata portata ad un volume triplo utilizzando Tobie liquido completo. La coltura è stata centrifugata a 350 g per 10', eliminato il surnatante e risospeso con Tobie liquido completo, ristabilito il volume iniziale della coltura per circa due volte. Nell'ultimo lavaggio il pellet è stato sospeso in un volume noto di PBS ed, infine, si è passati alla valutazione della concentrazione della coltura di *Leishmaniae*, tramite la tecnica di conteggio mediante l'uso della camera di Bürker.

## 8.1-Costruzione dei plasmidi di espressione con pGEM-T easy vector

Per questo studio è stato scelto il vettore di espressione , **pGEM-T easy vector** (PROMEGA), (figura 13)



**Figura. 13** Vettori plasmidico utilizzato

Il frammento di 116 pb contenente il gene codificante per la *Leishmania infantum* è stato isolato dal plasmide mediante una reazione di PCR (Mastercycler Gradient Eppendorf) utilizzando la coppia di primers primer forward : 5'-TAC ACC AAC CCC CAG-3' e reverse:5'-GGCGTTCTGCGAAAACCG-3', ricavati dal frammento del minicircolo del kinetoplasto di *Leishmania infantum*:

```

1 AGA ACG CCC CTC CCC CCA CGG ACC AGA AAA GTT TGG ATT TTT AGG
CCA TTT TTT GGG ATT T
61 TCA GCG TTT TCC AGC CAA TCC AGA CGC ATT CAG CCC AAA TTC CAA
TCG AAC AGC CAC AGC
121 CCA GCA CCT TCA GGC AAA GTA GTA CTC TAG TCC CGT CTA GTC TAG
TAC CAC ATC ATA AAC
181 CTA GCA TAC AAA TAA AAC GAT GTG CAA GTA TAG GTG ACA TTT AGC
TAT CAT TGA CGT TCT
241 ACA GAC CTT GCT TAC GTT ATA CCT AAC TTC AGA GAT CTT CGA ACA
TTA TAA TAC CAT GGA
301 ACT ATA GCA TCC CAT GTC TAT GCC TAA TAG GCA GTA TAC CCC TGT
AAT TAA TAT TAA ATA
    
```

361 TTA ATT ATA AGG TGT AAC AAG CCC ATT ACC ATA ACG AAA CAC CGT  
 ATG TGT CTA ACT CCA  
 421 AAA CTA AAA GTC TAA AGC TCG TTA GGG CCA CGA AGC TCA CAC ACA  
 GCC AAC CAC CCC GGT  
 481 CAA AGC CAA CCC CCA TTA ATA GCC GAC CAC AAA TCC CCA CAT ACA  
 CCC AAA ACA AAT GCA  
 541 CCC ACG GCC CCA AAC CCA G CAA ATC CAA CAT TTA AAG CCC CAA  
 AAT TAA AGA CAA ACT CC  
 601 AGC TAG CAC AAA ACA AGC CTCCCG ACC CAG GGC TCC AAG CCG ATC  
 CAG CCA AAA CAC CCA  
 661 AAT CCC CCG GGA CCA CCC GGC CCT ATT T **TA CAC CAA CCC CCA GTT**  
 TCC CGC CCC GGA GGC  
 721 CAA AAA TGA CAT TTT CGG GCC AAA AAT GAA CGG GAA TTT CTG CAC  
 CCA TT TTC **CGG TTT T**  
 781 **CGC AGA ACG CC**

Per tanto il frammento amplificato è 116 pb

Per la reazione di PCR è stato utilizzato il kit EURO TAQ(euroclone) allestendo una reazione con un volume finale di 50 µl:

REAGENTE	QUANTITÀ UTILIZZATA	CONCENTRAZIONE FINALE
Buffer 10 X	5 µl	1X
dNTP 10 mM	1 µl	200 µM
Primer F 10 µM	1 µl	0.2 µM
Primer R 10 µM	1 µl	0.2 µM
Taq 5U/µl	0.25 µl	1.25 U
pGEM-T easy vector (15 µg/ml)	1 µl	15 ng

Il termal-cycler è stato impostato con il seguente programma:

• 95°C per 4 minuti

• 35 cicl  $\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C per } 50'' \\ 65^{\circ}\text{C per } 1' \\ 72^{\circ}\text{C per } 1' \end{array} \right.$

• 72°C per 5 minuti

Il prodotto di PCR è stato controllato in elettroforesi su gel d'agarosio al 2% ed in seguito è stato purificato con GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) secondo il seguente protocollo:

2. collocare la colonnina con il filtro dentro la provetta, aggiungere 500 µl di Column preparation Solution e centrifugare a 12000 x g per 1 minuto
3. aggiungere 5 volumi di Binding Solution per 1 volume di prodotto di PCR, miscelare e centrifugare a 16000 x g per 1 minuto
4. aggiungere 500 µl di Wash Solution e centrifugare due volte a 16000 x g per 1 minuto
5. trasferire la colonnina in una nuova provetta e aggiungere 50 µl di Elution Solution e lasciare in eluizione per 1 minuto a temperatura ambiente; centrifugare la spin column a 16000 x g per 1 minuto
6. recuperare l'eluato e quantificare allo spettrofotometro

L'amplificato così purificato è stato digerito con gli enzimi di restrizione BamHI ed EcoRI. I vettori plasmidici prescelti sono stati digeriti con gli stessi enzimi di restrizione ed in seguito sono stati defosforilati con il kit Alkaline Phosphatase (Roche) per ridurre il tasso di ricircularizzazione del vettore digerito da un solo enzima. La defosforilazione è stata condotta aggiungendo alla soluzione contenente i vettori:

REAGENTE	QUANTITÀ UTILIZZATA
Dephosphorilation Buffer 10X	5 µl
Alkaline Phosphatase	4 µl
H <sub>2</sub> OMQ sterile	21 µl

Il campione così composti è stato lasciato ad incubare un'ora a temperatura ambiente. I prodotti di digestione sono stati separati su gel d'agarosio al 2%; le bande sono state tagliate ed il vettore ed inserto digerito sono stati purificati con il kit Perfectprep® Gel Cleanup procedure (Eppendorf) seguendo il protocollo allegato:

1. tagliare la banda dal gel e pesarla
2. aggiungere 3 volumi di Binding Buffer per ogni volume di gel e incubare a 50°C per 5-10 minuti, vortexando ogni 2-3 minuti
3. aggiungere un volume di isopropanolo e miscelare bene per inversione
4. aggiungere il campione alle spin column, centrifugare a 6000-10000 x g per un minuto ed eliminare l'eluato
5. aggiungere 750 µl di Wash Buffer alla spin column, centrifugare a 6000-10000 x g per un minuto ed eliminare l'eluato
6. centrifugare a 6000-10000 x g per un minuto, per eliminare il Wash Buffer residuo, ed eliminare l'eluato
7. mettere la spin column in una provetta pulita, aggiungere 30 µl di Elution Buffer e centrifugare a 6000-10000 x g per un minuto
8. eliminare la spin column e recuperare l'eluato

I prodotti di PCR purificati e digeriti sono stati quindi clonati nei vettori prescelti con il kit Rapid DNA Ligation Kit, secondo il seguente protocollo:

- 3) diluire l'inserto ed il vettore nel DNA Dilution Buffer 1X fino ad un volume finale di 10 µl
- 4) aggiungere 10 µl di T4 DNA Ligation Buffer e miscelare accuratamente
- 5) aggiungere 1 µl di T4 DNA Ligase e miscelare accuratamente
- 6) incubare per 5 minuti a 15-25°C

Il ceppo di cellule competente JM109 High Efficiency (Promega) è stato trasformato con i plasmidi costruiti mediante protocollo che fa uso dello shock termico:

- aggiungere 4 µl del plasmide ricombinante in una provetta contenente cellule competente JM109 High Efficiency (Promega)
- incubare in ghiaccio per 30 minuti
- incubare a 42°C per 30 secondi
- trasferire immediatamente la provetta con le cellule in ghiaccio
- aggiungere 900 µl di LB a temperatura ambiente
- incubare su agitatore a 37°C per 1 ora

• piastrare su LB agar addizionato con ampicillina/IPTG/X-Gal (50 µg/ml) ed incubare o/n. Le piastre incubate o/n sono state osservate e si sono potuti identificare i cloni trasformanti sulla base della resistenza all'ampicillina ( Figura 14 ), precisamente i ricombinanti erano caratterizzati dall'aver colonie bianche mentre quelli che contengono il solo vettore richiuso sono colonie blu resistenti all'ampicillina ma privi dell'inserito di interesse.

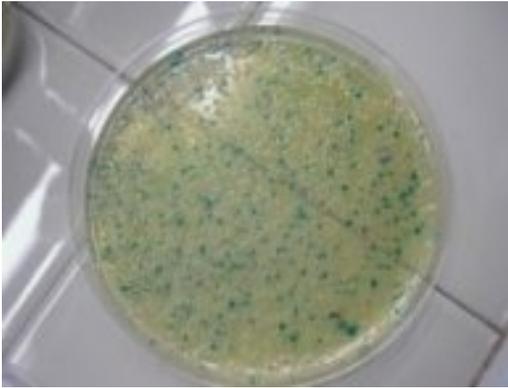


Figura 14: Piastra contenente le colonie di cloni blu e bianche.

Le colonie ricombinanti antibiotico-resistenti sono state selezionate, messe in crescita in 3 ml di LB con ampicillina (50 µg/ml) e incubate o/n; il giorno seguente è stata effettuata una estrazione miniprep con il kit Plasmid DNA isolation Miniprep kit (Qiagen):

1. pellettare i batteri
2. risospingere il pellet in 250 µl di Buffer P1 e trasferire in una provetta da microcentrifuga
3. aggiungere 250 µl di Buffer P2 e miscelare invertendo la provetta 4-6 volte
4. aggiungere 350 µl di Buffer N3 e miscelare bene invertendo la provetta 4-6 volte finché la soluzione non risulta omogenea
5. centrifugare per 10 minuti a 12000 x g
6. prelevare il surnatante e caricarlo nella spin column
7. centrifugare per 1 minuto a 12000 x g ed eliminare l'eluato
8. lavare la spin column aggiungendo 750 µl di PE Buffer e centrifugare per un minuto a 12000 x g
9. eliminare l'eluato e centrifugare nuovamente la spin column per 1 minuto a 12000 x g
10. mettere la spin column in una provetta pulita ed aggiungere 50 µl di Elution Buffer
11. lasciare 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugare per 1 minuto a 12000 x g
12. recuperare l'eluato e quantificare allo spettrofotometro

I plasmidi purificati sono stati sottoposti a digestione di controllo con *Bam*HI ed *Eco*RI. Le

colonie trasformate con il plasmide ricombinante sono state rimesse in coltura in 100 ml di terreno LB addizionato con ampicillina (50 µg/ml) e incubate a 37°C o/n; le colture batteriche sono state utilizzate per ottenere preparazioni maxiprep con il kit Plasmid DNA Isolation Maxiprep kit (Qiagen) secondo il seguente protocollo:

2. pellettare la coltura batterica
3. risospendere il pellet in 10 ml di Buffer P1
4. aggiungere 10 ml di Buffer P2, miscelare invertendo vigorosamente 4-6 volte e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti
5. aggiungere 10 ml di Buffer P3, miscelare vigorosamente invertendo 4-6 volte e incubare in ghiaccio per 20 minuti
6. centrifugare a 20000 x g per 30 minuti a 4°C
7. equilibrare le colonne con 10 ml di Buffer QBT e lasciar eluire per gravità
8. aggiungere il surnatante dello step 5 alla colonna equilibrata e lasciare eluire per gravità
9. lavare la colonna con 60 ml di Buffer QC e lasciare eluire per gravità
10. eluire il DNA con 15 ml di Buffer QF
11. precipitare il DNA aggiungendo 10.5 ml di isopropanolo a temperatura ambiente e centrifugare a 15000 x g per 30 minuti a 4°C
12. eliminare delicatamente il surnatante e lavare il pellet di DNA con 1 ml di etanolo 70% a temperatura ambiente
13. trasferire in una provetta da micro centrifuga e centrifugare per 10 minuti alla massima velocità
14. eliminare il surnatante e asciugare il DNA all'aria
15. risospendere in 100 µl di TE

Le sospensioni ottenute sono state amplificate tramite pcr qualitativa ( figura 14) per essere certi di aver amplificato il gene di *Leishmania infantum*. Abbiamo caricato su un gel di poliacrilammide al 2% 5 µl di eluito ( colonna 1 2 e 3 ) il ladder di riferimento, 50 pb, ( in colonna 4 ) ed il controllo negativo (colonna 5 ).

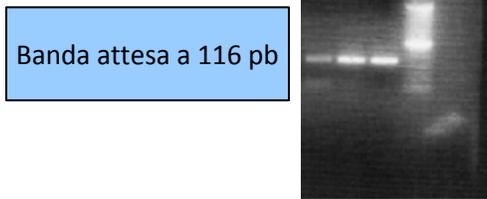


Figura. 14. colonna 1 2 e 3 amplificato gene *Leishmania infantum* ; colonna 4 Ladder 50 pb; colonna 5 controllo negativo della PCR

## 8.2- Microtitolazione mediante PCR Real Time

Il sistema di PCR in real time è stato sviluppato su Abi Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystem), sfruttando la chimica TaqMan Master Mix (Applied Biosystem) che prevede l'uso di una coppia di primers ( il primer forward : 5'-TAC ACC AAC CCC CAG-3' ed il reverse:5'-GGCGTTCTGCGAAAACCG-3' ) e di una sonda marcata (Leish Probe : 5'-FAMTGGGTGCAGAAATCCCGTTCA-3' ). La miscela di reazione per il test è stata sviluppata come segue: 12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0.5 mM ciascun primer, 0.2 mM sonda marcata, 1X Exo IPC mix e Exo IPC DNA (Applied Biosystem), 50 ng di DNA di estratto e H<sub>2</sub>O fino al completamento del volume di reazione (25ml).

<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Concentrazione finale</b>	<b>1 campione</b>	<b>1 campione in duplicato</b>
<b>2HO</b>		4,8 µl	9,6 µl
<b>x2 Universal Master Mix</b>	<b>1x</b>	10 µl	20 µl
<b>Primers: Q-leish Forward</b> 5'-TAC ACC AAC CCC CAG-3'/ <b>Reverse</b> <b>50 pmol/ul</b> 5'-GGC GTT CTG CGA AAA CCG-3'	<b>0,5 mM</b>	0,2 µl +0,2 µl	0,4 µl+0,4 µl
<b>Sonda: Q-leish Probe 2</b> <b>10 pmol/ul</b> 5' -FAM TGG GTG CAG AAA TCC CGT TCA-3'	<b>0,2 mM</b>	0,8 µl	1 µl
<b>DNA</b>	<b>50 ng</b>	2 µl	4 µl

In questa mix i due kit Applied Biosystems rappresentano rispettivamente il tampone di reazione e la miscela per il controllo interno. Le 40 ripetizioni del programma di amplificazione, sono state ottimizzate come segue: 95°C per 15 sec, 60°C per 60 sec; precedute da un passaggio a 50°C per 2 min e a 95°C per 10 min.

Per la microtitolazione sono stati usate due tipi di diluizione una data dal plasmide ed una data dalle cellule di *Leishmania* coltivate.

I test sono stati effettuati adoperando una curva di taratura standard, ottenuta saggiando diluizioni successive in base 10, di una soluzione madre di DNA estratto da 10<sup>7</sup> promastigoti del ceppo MHOM/IT/80/IPT1 di *Leishmania infantum*. Ed una seconda curva di taratura formata da diluizioni successive in base 10, in numero di copie, del plasmide clonato.

Il numero di copie di frammenti clonato è stato ottenuto dai seguenti calcoli:

il plasmide è stato letto allo spettrofotometro ed il risultato è 20 ng/µl

$$M = \frac{g}{PM} \text{ del costrutto} \quad M = \frac{20}{2069100} = 9,7 * 10^{-6}$$

La soluzione quindi ottenuta di 20 ng/µl è pari a 9,7\* 10<sup>-6</sup> M

$$\text{sapendo che } 1:6,022 * 10^{23} (\text{n}^\circ \text{ di Avogadro}) = 9,7 * 10^{-6} : X$$

$X=58 \cdot 10^{17}$  n° di molecole/ml di soluzione a 20 ng/ $\mu$ l mentre una soluzione di 1 ng/ $\mu$ l di costruito di 3135 pb (esattamente il nostro plasmide) è pari a :

$$8 \cdot 10^{17} : 20 = X : 1 \quad X = 3 \cdot 10^{17} \text{ n° di molecole corrispondenti a } 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Tramite opportune diluizioni mi sono creata questa scala di copie genomiche ( Tabella 1)

Clon dil 1	1,00E+09
Clon dil 2	1,00E+08
Clon dil 3	1,00E+07
Clon dil 4	1,00E+06
Clon dil 5	1,00E+05
Clon dil 6	1,00E+04
Clon dil 7	1,00E+03
Clon dil 8	1,00E+02
Clon dil 9	1,00E+01
Clon dil 10	1,00E+00

Tabella 1 : diluizioni delle copie del frammento clonato

E' stata eseguita una PCR real time con il DNA estratto dal ceppo di *Leishmania infantum* ed il DNA dal frammento clonato

I dati relativi alle ripetizioni dei test di PCR real time, hanno mostrato un Ct di equivalenza tra le due curve tra una diluizione della carica parassitaria e un preciso valore del numero di copie. (tabella 2)

Sample Nam	Qty Mean	Ct
Standard 1	1,00E+07	17
Standard 1	1,00E+07	17
Standard 2	1,00E+06	20
Standard 2	1,00E+06	20
Standard 3	1,00E+05	23
Standard 3	1,00E+05	23
Standard 4	1,00E+04	26
Standard 4	1,00E+04	26
Standard 5	1,00E+03	29
Standard 5	1,00E+03	29
Standard 6	1,00E+02	32
Standard 6	1,00E+02	32
Standard 7	1,00E+01	35
Standard 7	1,00E+01	35
Standard 8	1,00E+00	38
Standard 8	1,00E+00	38
NTC	Undetermined	40
NTC	Undetermined	40
Clon dil 1	1,00E+06	20
Clon dil 1	1,00E+06	20
Clon dil 2	4,99E+05	21,44
Clon dil 2	4,99E+05	21,44
Clon dil 3	4,25E+04	25,19
Clon dil 3	4,25E+04	25,19
Clon dil 4	1,00E+04	26
Clon dil 4	1,00E+04	26
Clon dil 5	1,01E+03	29,08
Clon dil 5	1,01E+03	29,08
Clon dil 6	3,45E+02	31
Clon dil 6	3,45E+02	31
Clon dil 7	3,25E+01	33,52
Clon dil 7	3,25E+01	33,52
Clon dil 8	1,2	39
Clon dil 8	1,2	39
Clon dil 9	0	40
Clon dil 9	0	40
Clon dil 10	0	40
Clon dil 10	0	40

Tabella 2 : Risultati della piastra real time

Esattamente si è notato che in  $10^6$  Leishmanie corrisponde un valore di Ct equivalente al valore riscontrato in  $10^9$  copie genomiche ( cloni).

## 9- Terreni e reagenti utilizzati

Le quantità riportate si riferiscono alla preparazione di un litro di soluzione

➤ PBS 10X:

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4 g

La soluzione viene portata a pH 7.4.

➤ TBS 1X:

Tris	2.42 g
NaCl	29.24 g

Portare a pH 7.5 con HCl.

➤ Terreno LB liquido:

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
H <sub>2</sub> OMQ	a volume

La soluzione viene portata a pH 7 con NaOH 5 M.

➤ Terreno LB agar:

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
Agar batteriologico europeo	14 g
H <sub>2</sub> OMQ	a volume

La soluzione viene portata a pH 7 con NaOH 5 M.

➤ Tampone TAE 1X:

Tris acetato	0.04 M
EDTA	1 mM

➤ TE buffer:

Tris HCl	10 mM pH 8.0
EDTA	0.1 mM pH 8.0

➤ Terreno TY:

Quantità per un litro di terreno:

10 gr Tryptone

5 gr Estratto di lievito,

10 gr NaCl

➤ Piastre TY:

Quantità per un litro di terreno:

10 gr Tryptone

5 gr Yeast Extract

10 gr NaCl

15 gr Agar

➤ Piastre TY + Ampicilina:

Come le piastre TY ed aggiungere 1 ml di una soluzione di Ampicilina

100mg/ml

➤ IPTG stock solution (0.1M)

1.2 g IPTG in 50ml

Sterilizzare per filtrazione e conservare a 4°C

➤ Xgal

100mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-p-D-galactoside

Sciogliere in 2 ml di N,N-dimetilformammide

Coprire con carta di alluminio e conservare a -20°C.

## 10-Risultati e conclusioni

In Sud America e in Europa, l'uso di metodologie molecolari ed in particolar modo della PCR quantitativa, in aree endemiche, ha mostrato di essere più sensibile dei metodi sierologici e dell'esame colturale nella diagnosi della leishmaniosi canina; suggerendo che questa metodologia potrebbe diventare il “*gold standard*” per la rilevazione dell'infezione della *Leishmania spp* (Gomes Y.M. *et al.*, 2008).

Questi metodi altamente sensibili, specifici e riproducibili permettono anche di analizzare numerosi campioni in tempi brevi. Essi garantiscono una diagnosi puntuale dell'infezione del protozoo evidenziando bassissimi livelli di DNA di *Leishmania* ed intercettando soggetti asintomatici, oltre a quelli sintomatici.

Ciò permette di effettuare le opportune scelte di controllo, prevenzione e cura della malattia, facilitando il monitoraggio della carica parassitaria durante e dopo il trattamento farmacologico.

Infatti, i farmaci attualmente disponibili non garantiscono l'eliminazione del parassita e questo può portare il soggetto ad andare incontro a recidive.

Il test PCR real time, inoltre, può essere considerato utile nei casi in cui non sia possibile una chiara diagnosi in base ai risultati della sierologia contribuendo a rivelare casi di malattia che altrimenti potrebbero contribuire ulteriormente alla diffusione dell'infezione.

La messa a punto, tramite la real time PCR, di una curva standard ottenuta dal clonaggio di frammenti di *Leishmania* in un plasmide può rappresentare una metodica più appropriata nella valutazione dei risultati di PCR ottenuti, invece, che da una coltura di *Leishmania*.

Infatti la ricerca in oggetto del presente lavoro consente di giungere alle seguenti conclusioni:

- entrambe le metodiche sono affidabili.
- In entrambi i casi i risultati ottenuti permettono di eguagliare le due metodiche precisando che il risultato ottenuto è il seguente: 1 leishmania contiene 100 copie di frammento di kinetoplasto clonato.
- I risultati ai quali si perviene con il sistema del clonaggio sono più attendibili in quanto ottenuti mediante l'applicazione di formule chimiche matematicamente riscontrabili e ben precise, anziché un calcolo basato su previsioni e stime (conta la c.d. “camera di Burkner”).

## Bibliografia

- Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamim, N., Campino, L., Schnur, L., Jaffe, C.L., 1991a. An experimental model for canine leishmaniosis. *Parasite Immunol.* 13, 537–550.
- Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D., Conceicao-Silva, F.M., Santos-Gomes, G.M., Janz, J.G., 1991b. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77,557–561.
- Adamama-Moraitou, K.K., Rallis, T.S., Koytinas, A.F., Tontis, D., Plevraki, K., Kritsepi, M., 2007.
- Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 53–57.
- Alexander James, Satoška, Abhay R. and Russell David G.. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science* 112, 2993-3002.
- Alexander, B. and Maroli, M. 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 1–18.
- Alexandre-Pires G, de Brito MT, Alguero C, Martins C, Rodrigues OR, da Fonseca IP, Santos-Gomes G. 2010. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* Oct 15;137(3-4):275-83.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. 2005. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* Jun 15;106(1-2):151-8.
- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, Moreno J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* Apr;10(2):298-319. Review.
- Alvar J, Molina R, San Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, Gonzalez F, San Andres MD, Boggio J, Rodriguez F, et al. 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol.* Aug;88(4):371-8.
- Alvar Jorge, Canavate Carmen, Molina Ricardo, Moreno Javier and Nieto Javier. 2004. Canine Leishmaniasis. *Advances in parasitology*, vol. 57.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R., Moreno, J., 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 334–359.
- Andrade, H., Toledo, V., Marques, M., Silva, J., Tafuri, W., Mayrink, W., Genaro, O., 2002. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet. Parasitol.* 103, 71–81.
- Ashford R.W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 30(12-13):1269-81.
- Ashford, R.W., 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14, 523–532.
- Baldelli R, Piva S, Salvatore D, Parigi M, Melloni O, Tamba M, Bellini R, Poglayen G. 2011. Canine

leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel. *Vet Parasitol.* Feb 2. [Epub ahead of print].

Baneth, G. 2006. Leishmaniasis, In C. E. Greene (ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*, 3rd ed. Saunders-Elsevier, St. Louis, MO p. 685–698..

Baneth, G., Aroch, I., 2008. Canine leishmaniasis—a diagnostic and clinical challenge. *Vet. J.* 175, 14–15.

Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24, no.7, 324–330.

Banuls A.L., Hide M., Tibayrenc M. 1999. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *International Journal for Parasitology* 29:1137-1147.

Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology.* 64: 1–109.

Banuls AL, Hide M, Tibayrenc M. 2002. Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Apr;96 Suppl 1:S9-13.  
102

Baptista-Fernandes, T., Marques, C., Rodrigues, O.R., Santos-Gomes, G.M., 2007. Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30,41–53.

Barbieri C. L. 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology* 28, 329–337.

Barbosa de Deus, R., Mares Guia, M.L., Nunes, A.Z., Costa, K.M., Junqueira, R.G., Mayrink, W., Genaro, O., Tavares, C.A.P., 2002. *Leishmania* major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology* 9, 1356–1361.

Barrouin-Melo SM, Laranjeira DF, Santos SO et al. 2006. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 111: 251–61.

Barrouin-Melo, S., Laranjeira, D., Filho, F., Trigo, J., Juliao, F., Franke, C., Aguiar, P., Santos, W., Pontes-de-Carvalho, L., 2005. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet. J.* 171, 331–339.

Bates, P.A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37(10): 1097-1106.

Bates, P.A. and Rogers, M.E. 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* 4, 601–609.

Bauzer, L.G.; Souza, N.A.; Maingon, R.D.; Peixoto, A.A. 2007. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007, 102, 1-12.

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg.* Sep;55(3):273-7.

Bettini S & Gradoni L 1986. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implication for human leishmaniasis. *Insect Science and its Applications* 7, 241–245.

- Bettini, S., Pozio, E. and Gradoni, L. 1980. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (II) *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74, 77–83.
- Beverley SM, Turco SJ. 1998. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol.* 6, 35–40.
- Biocca E.; Coluzzi A.; Costantini R. 1977. Osservazioni sull'attuale distribuzione dei flebotomi italiani e su alcuni caratteri morfologici differenziali tra le specie del sottogenere *Phlebotomus* (*Larrousius*). *Parassitologia*, 19, 19–37.
- Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadore, J.L., Bourdoiseau, G., 2001. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet. J.* 162, 108–120.
- Boarino, A., Scalone, A., Gradoni, L., Ferroglio, E., Vitale, F., Zanatta, R., Giuffrida, M.G., Rosati, S., 2005. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 647–653.
- Bogdan, C., Schonian, G., Banuls, A.L., Hide, M., Pratlong, F., Lorenz, E., Rollinghoff, M., Mertens, R. 2001. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 32, 302–306.
- Bongiorno G.; Habluetzel A.; Khoury C.; Maroli M. 2003. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop.* 88(2), 109–16.
- Bottero, E., Poggi, M., Viglione, M., 2006. Lesioni papulari indotte da *Leishmania* spp in 8 cani giovani. *Veterinaria* 1, 33–36.
- Bourdeau, P. and Groulade, P. 1988. Results of an inquiry into leishmaniasis. *Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animale de Compagnie* 23, supplement 5, 5–10.
- Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E., Boehringer, C., Stolle, T., Chabanne, L., 1997a. Specific IG1 and IG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59, 21–30.
- Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Magnol, J.P., Saint-Andre, I., Chabanne, L., 1997. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56, 345–351.
- Brandonisio, O., Altamura, M., Carelli, G., 1988. Lymphocyte functions in *Leishmania infantum* infected dogs. *J. Immunopharmacol.* 9, 37–40.
- 103
- Bruce-Chwatt LJ. 1972. Blood transfusion and tropical disease. *Trop Dis Bull.* Sep;69(9):825-62. Review
- Bueno, R., Carvalho Neta, A.V., Xavier, M.N., Oliveira, R.G., Diniz, S.A., Melo, M.N., Santos, R.L., 2009. cDNA sequencing and expression of *Nramp1* (*Slc11a1*) in dogs phenotypically resistant or susceptible to visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 332–339.
- 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(1-2), 193–7.
- Cardo LJ. 2006. *Leishmania*: risk to the blood supply. *Transfusion.* Sep;46(9):1641-5. Review.

- Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M. 1998. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol.* Nov 16;79(3):213-20.
- Carrillo Eugenia, Moreno Javier. 2009. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128, 67–70.
- Carrillo, E., Ahmed, S., Goldsmith-Pestana, K., Nieto, J., Osorio, Y., Travi, B., Moreno, J., McMahon-Pratt, D., 2007. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 25, 1534–1543.
- Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas, M., Mart?nez, E., Valladares, B., Canavate, C., Requena, J., Lopez, M., Alvar, J., Moreno, J., 2008. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 1902–1911.
- Carvalho, E.M., Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Barral-Netto, M., Badaro, R., Rocha, H., Johnson Jr., W.D., 1992. Immunological markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. *J. Infect. Dis.* 165, 535–540.
- Cavalcante R.; Pereira M.; Gontijo N. 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology*, 127(Pt 1), 87–93.
- Cavalcanti Milena de Paiva, Felinto Maria Edileuza de Brito, Wayner Vieira de Souza, Gomes Yara de Miranda, Abath Frederico G.C. 2009. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *The Veterinary Journal* 182:356–358.
- Chamizo, C., Moreno, J., Alvar, J., 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 67–75.
- Chang KP McGwire SB. 2002. Molecular, determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 1, 1–7.
- Chang KP Reed SG, McGwire BS, Soong L. 2003. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta. Trop.* 85, 375–390.
- Chicharro C, Sirera G, Ares M, Sans A, Videla S, Alvar J. 1999. Is *Leishmania infantum* zymodeme MON-253 involved in an outbreak among intravenous drug users? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Jul-Aug;93(4):385-6.
- Cortes, S., N. Rolao, J. Ramada, and L. Campino. 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98:12–17.
- Costa, C.H., Stewart, J.M., Gomes, R.B., Garcez, L.M., Ramos, P.K., Bozza, M., Satoskar, A., Dissanayake, S., Santos, R.S., Silva, M.R., Shaw, J.J., David, J.R., Maguire, J.H., 2002. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 334–337.
- Costa, F.A., Goto, H., Saldanha, L.C., Silva, S.M., Sinhorini, I.L., Silva, T.C., Guerra, J.L., 2003. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet. Pathol.* 40, 677–684.
- D'Urso V, Ruta F, Khoury C, Bianchi R, Depaquit J, Maroli M. 2004. About the presence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae) in Eastern Sicily, Italy. *Parasite.* Sep;11(3):279-83.

Dantas-Torres F. 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* Nov 10;149(3-4):139-46.Review.

Dantas-Torres Filipe. 2011. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in Parasitology* Vol. 27(4): 155-159.

Dantas-Torres, F., Brandao-Filho, S.P., 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 48, 151–156.

David, J.R. et al. 2001. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 839–847.

Davies C.R., Cooper A.M., Peacock C., Lane R.P., Blackwell J.M., 1990. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* 101, 337-343.

De Freitas E. et al. 2006. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet. Parasitol.* 137, 159–167

De Luna, R., Vuotto, M.L., Ielpo, M.T., Ambrosio, R., Piantedosi, D., Moscatiello, V., Ciaramella, P., Scalone, A., Gradoni, L. and Mancino, D. 1999. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 70, 95–103.

Dedet Jean-Pierre. 2010. The control of diseases transmitted by phlebotomine sandflies to humans, ever achievable? 5th Symposium of the CVBD World Forum in New York City, USA April 12 – 15.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. 1994 Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jul-Sep;89(3):463-9.

Dereure, J., El-Safi, S.H., Bucheton, B., Boni, M., Kheir, M.M., Davoust, B., Pratlong, F., Feugier, E., Lambert, M., Dessein, A., Dedet, J.P., 2003. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host–parasite relationships. *Microbes Infect.* 5, 1103–1108.

Dereure, J., Rioux, J.A., Gallego, M., Perieres, J., Pratlong, F., Mahjour, J., Saddiki, H., 1991. *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 595.

Desjeux P. 1991. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory. WHO/LEISH/91.30. Geneva: World Health Organization.

Desjeux, P. 2001. The increase of risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 239-243.

Desjeux, P., 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol.* 14, 417–423.

Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R. 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis.* Nov;25(5):1240-2.

Diniz, S., Melo, M., Borges, A., Bueno, R., Reis, B., Tafuri, W., Nascimento, E., Santos, R., 2005. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in semen of naturally infected dogs. *Vet. Pathol.* 42, 650–658.

- El Sawaf B.; el Sattar S.; Shehata M.; Lane R.; Morsy T. (1994). Reduced longevity and fecundity in Leishmania-infected sand flies. *Am J Trop Med Hyg*, 51(6), 767–70.
- Eltoum IA, Zijlstra EE, Ali MS, Ghalib HW, Satti MM, Eltoum B, el-Hassan AM.(1992). Congenital kala-azar and leishmaniasis in the placenta. *Am J Trop Med Hyg*. 1992 Jan;46(1):57-62.
- Ferreira Ede, C., de Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., da Silva, E.S., Schallig, H., Gontijo, C.M., 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* 146, 235–241.
- Ferreira Sde, A., Ituassu, L.T., Melo, M.N., Andrade, A.S., 2008. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 152,257–263.
- Ferrer L. 1999. Clinical aspects of canine Leishmaniasis. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*. Barcelona. ed. Hoechst Roussel Vet, 6-10.
- Ferrer L. 2002. The pathology of canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick R, ed. *Canine leishmaniasis: Moving Towards a Solution*. *Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum*. Sevilla, Spain, Intervet International BV, 2002: 21–4.
- Ferrer, L. 1989. Leishmaniosis canina en Espana: datos para el clínico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 7, 293–295.
- Ferrer, L., Rabanal, R., Fondevila, D., Ramos, J.A., Domingo, M., 1988. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.* 29, 381–388.
- Ferrer, L.; Solano-Gallego, L.; Arboix, M.; Alberola, J. 2000. Evaluation of the specific immune response in dogs infected by *Leishmania infantum*. In: Thoday, K.L., Foil, C.S., Bond, R. (Eds.), *Advances in Veterinary Dermatology*, vol. 4. Blackwell Science, Oxford, pp. 92–99.
- Ferroglio, E., Vitale, F., 2006. Diagnosis of leishmaniosis: between old doubts and new uncertainties. *Vet. Res. Commun.* 30, 35–38.
- Fisa, R., Riera, C., Gallego, M., Manubens, J., Portus, M., 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet. Parasitol.* 99, 105–111.
- Fondevila, D., Vilafranca, M. and Ferrer, L. 1997. Epidermal immuno-competence in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immuno-pathology* 56, 319–327.
- Font, A., Roura, X., Fondevila, D., Closa, J.M., Mascort, J. and Ferrer, L. 1996. Canine mucosal leishmaniasis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 32, 131–137.
- Franceschi, A., Merildi, V., Guidi, G., Mancianti, F., 2006. Occurrence of Leishmania DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. *Vet. Res. Commun.* 31, 335–341.
- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221.
- Gaeta, G.B., Gradoni, L., Gramiccia, M., Martino, L., Pizzuti, R., Pempinello, R., Scotti, S. and Maisto, A. 1994. Leishmaniosi viscerale in Italia. *Epidemiologia, clinica, terapia*. *Recenti Progressi di Medicina* 85, 340–347.

- Garin YJ, Sulahian A, Pratlong F. 2001. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infect. Immun.* 69, 7365–7373.
- Gomes, A. H., I. M. Armelin, S. Z. Menon, and V. L. Pereira-Chioccola. 2008. *Leishmania* (V.) *braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 119:319–324.
- Gomes, Y.M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R.A., Abath, F.G., Alves, L.C., 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet. J.* 175, 45–52.
- Gossage, S.M. et al. 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.* 33, 1027–1034.
- Gradoni L, Ascenzi P. 2004. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. *Parassitologia.* Jun;46(1-2):101-3. Review.
- Gradoni L.; Gramiccia M.; Leger N.; Pesson B.; Madulo-Leblond G.; Killick-Kendrick R.; Killick-Kendrick M.; Walton B. C. 1991. Isoenzyme characterization of *Leishmania* from man, dog and sandflies in the maltese island. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2(85), 217–219.
- Gradoni Luigi, Gramiccia Marina, Khoury Cristina, Maroli Michele. 2004. Linee guida per il controllo del serbatoio canino della leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. *Rapporti ISTISAN* 04/12.
- Gradoni, L., Maroli, M., Gramiccia, M., Mancianti, F., 1987. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med. Vet. Entomol.* 1, 339–342.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169–1180.
- Griscelli, F., Barrois, M., Chauvin, S., Lastere, S., Bellet, D., Bourhis, J.H. 2001. Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4362-4369.
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribanez, M.A., Alvar, J., Castillo, J.A., 2000. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res. Vet. Sci.* 69, 249–253.
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribanez, M.A., Castillo, J.A., 2002. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 13–20.
- Guy M.; Killick-Kendrick R.; Gill G.; Rioux J.; Bray R. 1984. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cevennes by bloodmeal analyses. *Ann Parasitol Hum Comp*, 59(5), 449–58.
- Hall LR, Titus RG. 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J. Immunol.* 155, 3501–3506.
- Handman Emanuela and Bullen Denise V. R.. 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *TRENDS in Parasitology* Vol.18 No.8 August 2002.
- Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L., Locksley, R.M., 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis: evidence

for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* 169, 59–72.

Helal H, Ben-Ismaïl R, Bach-Hamba D, Sidhom M, Bettini S, Ben Rachid MS. 1987. An entomological survey in the focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis (*Leishmania major*) of Sidi Bouzid (Tunisia) in 1985. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1987;80(3):349-56. French.

Hervas Rodríguez, J., Mozos, E., Mendez, A., Perez, J. and Gomez-Villamandos, J.C. 1996. *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts in vivo. *Veterinary Pathology* 33, 469–473.

Herwaldt, B., 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191–1199.

Holzmüller P, Bras-Goncalves R, Lemesre JL. 2006. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology.* 132 Suppl:S19-32.

Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol.* Apr 18;113(2):99-113.

Iniesta L, Gallego M, Portus M. 2005. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* Jan 10;103(1-2):77-81.

Iniesta, L., S. Fernandez-Barredo, B. Bulle, M. T. Gomez, R. Piarroux, M. Gallego, J. M. Alunda, and M. Portus. 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:1137–1141.

IRIS, 2006. IRIS staging of chronic renal disease (International Renal Interest Society. <http://www.irikidney.com/guidelines/en/stagingckd.shtml>).

Julia, V., Rassoulzadegan, M., Glaichenhaus, N., 1996. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* 274, 421–423.

Jung et al. 2000. Quantitative PCR *Clin Chem Lab Med* 38:833-83.

Kalra NL, Bang YH. (1988). *Manual on entomology in visceral leishmaniasis.* Document SEA/VBC/35. New Delhi: World Health Organization.

Kamhawi Shaden. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *TRENDS in Parasitology* Vol.22 No.9

Kamhawi, S.; Ramalho-Ortigao, M.; Pham, V.M.; Kumar, S.; Lawyer, P.G.; Turco, S.J.; Barillas-Mury, C.; Sacks, D.L.; Valenzuela, J.G. 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell.* 119, 329-341.

Kato H., Abraham G. Caceres, Eduardo A. Gomez, Tatsuyuki Mimori, Hiroshi Uezato, Jorge D. Marco, Paola A. Barroso, Hiroyuki Iwata, and Yoshihisa Hashiguchi. 2008. Short Report: Molecular Mass Screening to Incriminate Sand Fly Vectors of Andean-type Cutaneous Leishmaniasis in Ecuador and Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(5), pp. 719–721.

Kato Hiroto, Gomez Eduardo A., Caceres Abraham G., Uezato Hiroshi, Mimori Tatsuyuki and Hashiguchi Yoshihisa. 2010. Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 814-826.

Kebaier C, Louzir H, Chenik M. 2001. Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infect. Immun.* 69, 4906–4915.

Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. 2006. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology.* 133 Suppl:S87-112.

Kedzierski L, Montgomery J, Bullen D, Curtis J, Gardiner E, Jimenez-Ruiz A, Handman E. 2004. A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. *J. Immunol.* 172:4902–4906.

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.* Jan;21(1):74-9.

Killick-Kendrick R 2002. Phlebotomine sand flies: biology and control. In: *World Class Parasites, vol 3 Leishmaniasis.* (Ed. J.P. Farrell), Boston: Kluwer Academic Press, 33-43.

Killick-Kendrick R. 1986. The transmission of leishmaniasis by the bite of the sandfly. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 132, 134–140.

Killick-Kendrick R. 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 4(1):1-24.

Killick-Kendrick R.; Rioux J.; Bailly M.; Guy M.; Wilkes T.; Guy F.; Davidson I.; Knechtli R.; Ward R.; Guilvard E.; et al. 1984. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cevennes. *Ann Parasitol Hum Comp*, 59(6), 555–72.

Killick-Kendrick, R. et al. 1997. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.* 11, 105–111.

Killick-Kendrick, R., and M. Killick-Kendrick 1999. Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniosis. In: Killick-Kendrick, R. (ed.): *Canine leishmaniasis: an update.* Proc. Int. Can. Leishm. Forum, Barcelona, Spain, 1999, Intervet Int., Boxmeer, The Netherlands, pp 26-31.

Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279-289.

Koehler, K., Stechele, M., Hetzel, U., Domingo, M., Schonian, G., Zahner, H., Burkhardt, E. 2002. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 109, 9–17.

Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, K.G., 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 376–383.

Koutinas, A.F., Scott, D.W., Kontos, V., Lekkas, S., 1992. Skin lesions in canine leishmaniasis (*Kala-Azar*): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Vet. Dermatol.* 3, 121–130.

Kuhls K, Chicharro C, Canavate C, Cortes S, Campino L, Haralambous C, Soteriadou K, Pralong F, Dedet JP, Mauricio I, Miles M, Schaar M, Ochsenreither S, Radtke OA, Schonian G. 2008. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl Trop Dis.* Jul 9;2(7):261

Kurey, I., Kobets, T., Havelkova, H., Slapnickova, M., Quan, L., Trtkova, K., Grekov, I., Svobodova, M., Stassen, A.P., Hutson, A., Demant, P., Lipoldova, M., 2009. Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after *Leishmania major* infection. *Immunogenetics* 61, 619–633.

Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Dereure, J., Lamothe, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic

carriers. *Parasitology* 125, 197–207.

Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J., Bastien, P., 2002a. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 210–215.

Lainson R, Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press 1:1-120.

Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 811–827.

Lanotte, G., Rioux, J.A., Perieres, J. and Vollhardt, Y. 1979. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes evolutives de la leishmaniose viscerale canine. Elaboration d'une typologie bioclinique a finalite epidemiologique. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 54, 277–295.

Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romao P, Cortes S, Rolao N, Gomes-Pereira S, Rica Capela MJ, Abranches P. 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol.* May 30;79(3-4):273-84.

Lemrani M, Nejjar R, Pratlong F. 2002. A new *Leishmania tropica* zymodeme--causative agent of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *Ann Trop Med Parasitol.* Sep;96(6):637-8.

Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ et al. 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *The Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 11234–6.

Liarte, D.B., Mendonca, I.L., Luz, F.C.O., Abreu, E.A.S., Mello, G.W.S., Farias, T.J.C., Ferreira, A.F.B., Millington, M.A., Costa, C.H.N., 2001. QBCO for the diagnosis of human and canine American visceral leishmaniasis: preliminary data. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34, 577–581.

Liew, F.Y., O'Donnell, C.A., 1993. Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 32, 161–259.

Lima WG, Oliveira PS, Caliari MV et al. 2007. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b / CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007; 117: 129–36.

Lohoff, M., Gessner, A., Bogdan, C., Rollinghoff, M., 1998. The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115, 191–212.

Madeira, M., Schubach, A., Schubach, T., Pereira, S., Figueiredo, F., Baptista, C., Leal, C., Melo, C., Confort, E., Marzochi, M., 2006. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Parasitol.* 138, 366– 370.

Maia C., Nunes M., Campino L. 2008. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* Aug;8(4):555-9.

Maia Carla, Nunes Monica, Cristovao Jose, Campino Lenea. 2010. Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Tropica* 116 (2010) 193–199

Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 158, 274–287.

Maia, C., Cristovao, J., Ramada, J., Rolao, N., Campino, L., 2006. Diagnostico da leishmaniose canina pela tecnica de PCR aplicada a sangue periferico em papeis de filtro Resultados preliminares. *Vet. Med.* 47,

29–33.

Maia, C., Ramada, J., Cristovao, J., Campino, L., 2007. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.*, January 179; 1:142-144.

Maia, C., Ramada, J., Cristovao, J.M., Goncalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 179, 142–144.

Mallinson DJ, Coombs GH. 1989. Interaction of leishmania metacyclics with macrophages. *Int J Parasitol.* Sep;19(6):647-56.

Mancianti F, Sozzi S. 1995. Isolation of *Leishmania* from a newborn puppy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Jul-Aug;89(4):402.

Mancianti F. 2004. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia.* Jun;46(1-2):203-6.

Mancianti, F., Falcone, M.L. Giannelli, C., 1990. Identificazione e caratterizzazione degli agenti di isolati di *Leishmania infantum* mediante sieri di cani affetti da leishmaniosi. *Atti della Societa Italia delle Scienze Veterinarie XLIV*: 1239-1242.

Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L. and Pieri, S. 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 566–567.

Mancianti, F., Meciani, N., 1988a. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counter immuno-electrophoresis. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1409-1411.

Mancianti, F., Poli, A. and Bionda, A. 1989. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia* 31, 213–230.

Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, et al. 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol*;142:271–80.

Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. 2009a. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci.* Aug;87(1):76-8.

Manna Laura, Reale Stefano, Picillo Esther, Vitale Fabrizio, Gravino Angelo Elio. 2008. Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. *Cytokine* 44 (2008) 288–292.

Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Pavone, L., Gravino, A., 2007. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimonite and allopurinol. *Vet. J.* 177, 279–282.

Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L.M., Gravino, A.E., 2008a. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.* 177, 279–282.

Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Della Morte, R., Cringoli, G., Staiano, N., Gravino, A.E., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 125, 251–262.

Manna, L.; Vitale, F.; Reale, S.; Picillo, E.; Neglia, G.; Vescio, F.; Gravino, A. E. 2009. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Journal Veterinary Journal* 2009 Vol. 182 No.3 pp.441-445.

Maroli M., Bigliocchi F., Khoury C., 1994.. I flebotomi in italia: osservazioni sulla distribuzione e sui metodi di campionamento. *Parassitologia*, 36(3), 251–64.

Maroli M.; Bettini S. 1977. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (I) An investigation on phlebotomine sandflies in Grosseto Province. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 71(4), 315–21.

Maroli M.; Khoury C. 1998. Leishmaniasis vectors in italy. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale*, 3(3-4), 69–75.

Maroli M.; Khoury C.; Bianchi R.; Ferroglio E.; Natale A. (2002). Recent findings of *phlebotomus neglectus* tonnoir, 1921 in Italy and its western limit of distribution. *Parassitologia*, 44(1-2), 103–9.

Maroli M.; Sansoni L.; Bigliocchi F.; Khoury C.; Valsecchi M. (1995). Reperimento di *phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 (=p. major s.l.) in un focolaio di leishmaniosi nel Nord Italia (provincia di Verona). *Parassitologia*, 37(2-3), 241–4.

Maroli Michele, Rossi Luca, Baldelli Raffaella, Capelli Gioia, Ferroglio Ezio, Genchi Claudio, Gramiccia Marina, Mortarino Michele, Pietrobelli Mario and Gradoni Luigi. 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine and International Health*. 13 no 2 pp 256–264.

Maroli, M. Mizzoni, V., Siragusa, C., D’Orazi, A. and Gradoni, L. 2001. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med. Vet. Entomol.* 15, 358–363.

Maroli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., 1987. Natural infection of *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., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 145, 357–360.

Martinez-Moreno, A., Moreno, T., Martinez-Moreno, F.J., Acosta, I., Hernandez, S., 1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48, 209–220.

Marty P, Izri A, Ozon C, Haas P, Rosenthal E, Del Giudice P, et al. 2007. A century of leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. *Ann Trop Med Parasitol.* 101(7):563-74.

Mary, C., Faraut, F., Drogoul, M.P., Xeridat, B., Schleinitz, N., Cuisenier, B., Dumon, H., 2006. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 858–863.

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.

Mazloumi-Gavvani, A.S., Hodjati, M.H., Mohite, H. and Davies, C.R. 2002. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet* 369, 374–379.

Menezes-Souza Daniel, Correa-Oliveira Rodrigo, Guerra-Sa Renata, Giunchetti Rodolfo Cordeiro, Teixeira-Carvalho Andrea, Martins-Filho Olindo Assis, Oliveira Guilherme Correa, Reis Alexandre Barbosa.

2011. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. *Vet Parasitol.* Apr 19;177(1-2):39-49.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., Deplazes, P., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5515–5519.
- Michalsky, E. M., M. F. Rocha, A. C. da Rocha Lima, J. C. Franca-Silva, M. Q. Pires, F. S. Oliveira, R. S. Pacheco, S. L. dos Santos, R. A. Barata, A. J. Romanha, C. L. Fortes-Dias, and E. S. Dias. 2007.
- Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147:67–76.
- Miranda, S., Martorell, S., Costa, M., Ferrer, L., Ramis, A., 2007. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. *Vet. Parasitol.* 144, 251–260.
- Miriam A. Lynna and W. Robert McMaster. 2008. *Leishmania*: conserved evolution – diverse diseases. *Trends in Parasitology.* Volume 24, Issue 3: 103-105.
- Miro G, Galvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA, Molina R. 2007. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet Parasitol.* Feb 28;143(3-4):375-9.
- Miro Guadalupe, Cardoso Luis, Pennisi Maria Grazia, Oliva Gaetano and Baneth Gad. 2008. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology* Vol.24 No.8, 371–377.
- Mohebali M, Hajjarian H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhouni B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhar M. 2005. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol.* May 15;129(3-4):243-51.
- Molina, R. et al. 2001. Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Vet. Ther.* 2, 261–267.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 491–493.
- Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. 2007. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol.* Apr 30;145(3-4):245-52.
- Moreno, J. and Alvar, J. (2002) Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18, 399–405.
- Moreno, J., Nieto, J., Chamizo, C., Gonzalez, F., Blanco, F., Barker, D.C., Alvar, J., 1999. The immune response and PMBC subsets in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *Vet. Immunol. And Immunopathol.* 71, 181–195.
- Mortarino M.; Franceschi A.; Mancianti F.; Bazzocchi C; Genchi C.; Bandi C. 2004. PCR quantitativa nella diagnosi di *Leishmania*. *Parassitologia* 46:163-167.

Mosser DM, Brittingham A. 1997. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* 115, S9–S23 .

Mosser DM, Edelson PJ. 1987. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* 327, 329–331.

Mullis KB, Faloona FA, 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Meth Enzymol.* 155:335-350.

Munstermann LE, Marquardt WC, Black WC, Freier JE, Hagedorn HH, Hemingway J, Higgs S, James AA, Kondratieff B, Moore CG. 2004. Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. *Biology of Disease Vectors*.

Second edition. San Diego, CA: Elsevier, 141–151.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G., 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561–1577.

Naucke, T.J., Schmitt, C. 2004. Is leishmaniasis becoming endemic in Germany? *Int. J. Med. Microbiol.* 293 Suppl 37, 179–181.

Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1666–1669.

Olivier Aoun, Charles Mary, Cedric Roqueplo, Jean-Lou Marie, Olivier Terrier, Aurelie Levieuge, Bernard Davoust. 2009. Canine leishmaniasis in south-east of France: Screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. *Veterinary Parasitology* 166: 27–31.

Ordeix, L., Solano-Gallego, L., Fondevila, D., Ferrer, L., Fondati, A., 2005. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet. Dermatol.* 16, 187–191.

Otranto D., Paradies P., de Caprariis D., Stannec D. k, TestinG. i, Grimm F., Deplazes P., and Capelli G. 2009. Toward Diagnosing *Leishmania infantum* Infection in Asymptomatic Dogs in an Area Where Leishmaniasis Is Endemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, Mar. 2009, p. 337–343.

Panaro MA, Brandonisio O, Cianciulli A, Cavallo P, Lacasella V, Paradies P, Testini G, De Caprariis D, Mitolo V, Otranto D. 2009. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology.* 2009 Jul;136(8):823-31

Panaro MA, Brandonisio O, de Caprariis D, Cavallo P, Cianciulli A, Mitolo V, Otranto D. 2008. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? *Parasit Vectors.* May 9;1(1):10.

Paul, William E. 1993. "Infectious Diseases and the Immune System." *Scientific American* 269, no. 3 90–97.

Pennisi, M.G., Reale, S., Giudice, S.L., Masucci, M., Caracappa, S., Vitale, M., Vitale, F., 2005. Realtime PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet. Res. Commun.* 29 (Suppl. 2), 301–303.

Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, Mischke R, Diniz P, Breitschwerdt EB, Kritsepi M, Garipidou VA, Koutinas CK, Lekkas S. 2008. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med.* Jul-Aug;22(4):866-72.

Piarroux, R., Gambarelli, F., Dumon, H., Fontes, M., Dunan, S., Mary, C., Toga, B., Quilici, M., 1994. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 746–749.

Pinelli, E., Gonzalo, R.M., Boog, C.J.P., Rutten, V.P.M.G., del Real, G., Ruitenber, E.J., 1995. *Leishmania infantum*-specific T cells lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility—complex restricted manner. *Eur. J. Immunol.* 25, 1594–1600.

Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bemadina, W., del Real, G., Ruitenber, J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229–235.

Pinelli, E., Rutten, V.P., Bruysters, M., Moore, P.F., Ruitenber, E.J., 1999. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect. Immun.* 67, 237–243.

Pinheiro PHC, Dias SS, Eulalio KD, Mendonca IL, Katz S, Barbieri CL (2005). Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. *Infect Immun* 73, 3787–3789.

Plevraki, K., Koutinas, A.F., Kaldrymidou, H., Roumpies, N., Papazoglou, L.G., Saridomichelakis, M.N., Savvas, I., Leondides, L., 2006. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J. Vet. Intern. Med.* 20, 228–233.

Podaliri Vulpiani, M., Iannetti, L., Di Mattia, T., Dalla Villa, P., 2008. *Leishmania infantum* in a Central Italy dog shelter: Retrospective study of serologic reactivity during a 4-year period in a confined dog population subjected to preventive and therapeutic treatment. *Vet. Parasitol.*, doi:10.1016/j.vetpar.2008.11.014.

Poli A, Abramo F, Mancianti F et al. 1991. Renal involvement in canine leishmaniasis: a lightmicroscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron* 1991; 57: 444–52.

Poot, J., Spreeuwenberg, K., Sanderson, S.J., Schijns, V.E., Mottram, J.C., Coombs, G.H., Vermeulen, A.N., 2006. Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine* 24,2460–2468.

Porrozzì, R., Santos da Costa, M.V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazzinelli, R.T., Campos-Neto, A., Grimaldi Jr., G., 2007. Comparative evaluation of enzyme-linked immuno-nosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin. Vaccine Immunol.* 14,544–548.

Pratlong, F., J. P. Dedet, P. Marty, M. Portus, M. Deniau, J. Dereure, P.Abranches, J. Reynes, A. Martini, M. Lefebvre, and J. A. Rioux. (1995). *Leishmania*-human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J. Infect. Dis.* 172:323–326.

Pratlong, F., Rioux, J.A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., Dedet, J.P., 2004. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4077–4082.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ. 2003. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* Feb 10;91(3-

4):161-8.

Quinnell RJ, Courtenay O. 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. Dec;136(14):1915-34. Review.

Quinnell, R.J., Courtenay, O., Shaw, M.A., Day, M.J., Garcez, L.M., Dye, C., Kaye, P.M., 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 183, 1421–1424.

Rallis, T., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Adamama-Moraitou, K.K., Papazoglou, L., Fytianou, A., Koutinas, A.F., 2005. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J. Comp. Pathol.* 132, 145–152.

Ranadhir Dey, Srijit Khan, Sushmita Pahari, Neetu Srivastava, Meenakshi Jadhav & Bhaskar Saha. 2007. Functional paradox in host–pathogen interaction dictates the fate of parasites . *Future Microbiol.* 2(4), 425–437.

Reale S, Maxia L., Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. *J. Clin. Microbiol.* 1999 Sep;37(9):2931-5.

Ready P. 2000. Sand fly evolution and its relationship to *Leishmania* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*;95(4):589-90.

Ready P. D. 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 11 March Vol. 15, Issue 10.

Ready P.D. 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. In: S de la Roque, editor. *Climate change: the impact on the epidemiology and control of animal diseases*. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 27(2):399-412.

Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M.G., Mayrink, W., Franca-Silva, J.C., Giunchetti, R.C., Genaro, O., Correa-Oliveira, R., 2006a. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81, 68–75.

Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Correa-Oliveira, R., 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 87–95.

Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A.M., Marques, M.J., Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Guerra, L.L., Andrade, R.A., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 102–116.

Reithinger, R., J. C. Espinoza, O. Courtenay, and C. R. Davies. 2003. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J. Clin. Microbiol.* 41:1486–1493.

Reithinger, R., Lambson, B.E., Barker, D.C., Counihan, H., Espinoza, C.J., Gonzalez, J.S., Davies, C.R., 2002. *Leishmania (Viannia)*spp. Dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96,76–78.

Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S., Jaffe, C.L., 1999. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 69–76.  
Ribeiro JM. 1989. Vector saliva and its role in parasite transmission. *Experimental Parasitology* 1989; 69: 104–6.

Rioux, J.A., Albaret, J.L., Houin, R., Dedet, J.P. and Lanotte, G. (1968). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les reservoirs selvatiques. Infestation spontanee du renard (*Vulpes vulpes* L.). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 43, 421–428.

Rioux, J.A., Killick-Kendrick, R., Leaney, A.J., Turner, D.P., Bailly, M. and Young, C.J. 1979. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 11. La leishmaniose viscerale canine: succes de la transmission experimentale chien–phlebotome–chien par la pique de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir 1921. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 54, 401–407.

Rolao N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. 2004. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol.* Oct;90(5):1150-4.

Rossi et al. 2005. Leishmap: the network for monitoring the spread of canine leishmaniasis and its vectors in northern Italy. Proc. Third World Congress on Leishmaniasis, Palermo-Terrasini 10–15 April 2005, p. 201.

Rosypal, A., Troy, G., Duncan, R., Zajac, A., Lindsay, D., 2005. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum*. *J. Vet. Inter. Med.* 19, 802–809.

Rosypal, A.C. Troy G.C., Zajac A.M., Frank G., Lindsay D.S. 2005a. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J. Parasitol.* 91, 970–972.

Roura, X., Fondevilla, D., Sanchez, A., Ferrer, L., 1999. Detection of *Leishmania* infection in paraffinembedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11, 385–387.

Sacks DL, Kamhawi S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 453–483.

Sacks, D.L. 2001. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell. Microbiol.* 3, 189-196.

Sacks, D.L., Perkins, P.V., 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223, 1417-1419.

Sacks, D.L.; Modi, G.; Rowton, E.; Spath, G.; Epstein, L.; Turco, S.J.; Beverley, S.M. 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,406-411.

Sanchez, M.A., Diaz, N.L., Zerpa, O., Negron, E., Convit, J., Tapia, F.J., 2004. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 618–624.

Santos-Gomes, G.M., Rosa, R., Leandro, C., Cortes, S., Romao, P., Silveira, H., 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88,21–30.

Saridomichelakis Manolis N. 2009. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, 2009; 20, 471–489.

Saridomichelakis, M.N. et al. (2005) Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am.J.*

Trop. Med. Hyg. 73, 82–86.

Scalone, A. et al. (2002) Evaluation of the Leishmania recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.* 104, 275–285.

Schulz, A., Mellenthin, K., Schonian, G., Fleischer, B., Drosten, C., 2003. Detection, differentiation and quantitation of pathogenic Leishmania organisms by fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1529–1535.

Sebastien Besteiro, Roderick A.M. Williams, Graham H. Coombs, Jeremy C. Mottram. (2007) Protein turnover and differentiation in Leishmania. *International Journal for Parasitology.* 2007 August; 37(10): 1063–1075.

Sharma Umakant & Sarman Singh. 2008. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45, December 2008, pp. 255–272.

Silva, E., Gontijo, C., Pirmez, C., Fernandes, O., Brazil, R., 2001. Detection of Leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 896–898.

Silva, E.S., Pirmez, C., Gontijo, C.M.F., Fernandes, O., Brazil, R.P., 2000. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Veterinary Record* 147, 421–422.

Slappendel, R.J. 1988. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Veterinary Quarterly* 10, 1–16.

Smith Deborah F., Christopher S. Peacock, and Angela K. Cruz. 2007. Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol.* September; 37(11-3): 1173–1186.

Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. 2004. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum-infected dogs. *J. Comp Pathol.* Jan;130(1):7-12.

Solano-Gallego L, Riera C, Roura X et al. 2001a. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary Parasitology* ; 96: 265–76.

Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2000. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. *Vet. Parasitol.* 90, 37–45.

Solano-Gallego, L., Morel, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 560–563.

Solano-Gallego, L., Rodriguez-Cortes, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X., Alberola, J., 2007. Detection of Leishmania infantum DNA by real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 147, 315–319.

Solano-Gallego, L.; Koutinas, A.; Miro, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Journal Veterinary Parasitology.* Vol. 165 No. 1/2 pp. 1-18.

Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction

using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA dogs. *Journal of Infectious Diseases* 189, 1729–1733.

Swaminath CS, Short HE, Anderson LAP. 1942. Transmission of Indian kala-azar to man by the bite of *P. argentipes*. *Indian J Med Res*; 30: 473–7.

Symmers WS. 1960. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet* 1960 Jan 16;1(7116):127-32.

Tafuri, W.L., Rosa de Oliveira, M., Melo, M.N. and Tafuri, W.L. 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology* 96, 203–212.

Tarallo Viviana D., Dantas-Torres Filipe, Lia Riccardo P., Otranto Domenico. 2010. Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy *Acta Tropica* 116, 227–234.

Theodos CM, Titus RG. 1993. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunology* 1993; 15: 481–7.

Torina A, Sole M, Reale S, Vitale F, Caracappa S. 2008. Use of phlebotomine sand flies as indicator of leishmania prevalence in an endemic area. *Ann N Y Acad Sci*. Dec;1149:355-7.

Vamvakidis, C.D., Koutinas, A.F., Kanakoudis, G., Georgiadis, G., Saridomichelakis, M., 2000.

Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet. Rec.* 146, 698–703.

Vexenat Ade C, Santana JM, Teixeira AR. 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. May-Jun;38(3):177-85.

Vianna, V.L., Takiya, C.M. and de Brito-Gitirana, L. 2002. Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. *Parasitology Research* 88, 829–836.

Vidor, E., Dereure, J., Pratlong, F., Dubreuil, N., Bissuel, G., Moreau, Y., Rioux, J.A., 1991. Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine a *Leishmania infantum*. Etude d'une cohorte en region cevenole. *Pratique Medicale et Chirurgicale de L'Animale de Compagnie* 26, 133–137.

Vinuelas, J., Garcia-Alonso, M., Ferrando, L., Navarrete, I., Molano, I., Miron, C., Carcelen, J., Alonso, C. and Nieto, C.G. 2001. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 101, 23–27.

Vitale, F., Reale, S., Vitale, M., Petrotta, E., Torina, A., Caracappa, S., 2004. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1026, 139–143.

WHO 1990. Control of the Leishmaniases. Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, No. 793:1-158.

Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, Weina P, Ockenhouse CF. 2005. Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg*. Dec;73(6):999-1004.

Young D. G.; Perkins P. V. 1984. Phlebotomine sand flies of north america (diptera: psychodidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 44, 263–304.

Young, D.G.; Duncan, M.A. (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae), *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54, Associated Publishers—American Entomological Institute, Gainesville, FL, USA, 1994.

Zarlenga, D.S., Higgins, J., 2001. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* 1, 215–230.