

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

"FEDERICOII"

Dipartimento Di Medicina Interna e Produzioni Animali



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE E

FARMACO-TOSSICOLOGICHE VETERINARIE

XXVI CICLO

Coordinatore: Prof. Paolo Ciaramella

Tesi in

MEDICINA INTERNA DEGLI ANIMALI DOMESTICI

STUDIO TRASVERSALE E LONGITUDINALE DELLO STATO

ANEMICO IN CANI AFFETTI DA LEISHMANIOSI CANINA

TUTOR

Prof. Gaetano Oliva

CANDIDATO

dott.ssa Galasso Caterina

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1: note generali sulla Leishmaniosi

1.1 CLASSIFICAZIONE DEL PARASSITA

1.1.2 organizzazione del genoma

1.1-3 vettore

1.1.4 ciclo biologico

1.2 PATOGENESI

1.3 ESAME CLINICO

1.3.1 segnalamento

1.3.2 sintomatologia

1.4 INDAGINI DI LABORATORIO

1.5 CLASSIFICAZIONE

1.6 DIAGNOSI

1.6.1 metodi cito-istologici

1.6.2 metodi parassitologici

1.6.3 metodi molecolari

1-6-4 metodi sierologici

1.7 TERAPIA

1.8 PROFILASSI

CAPITOLO 2: definizione di anemia e varie tipologie

2.1 DEFINIZIONE DI ANEMIA

2.2 VARIABILI CHE CARATTERIZZANO L'ANEMIA

2.2.1 risposta rigenerativa

2.2.2 indici eritrocitari

2.2.3 morfologia degli eritrociti

2.3 CLASSIFICAZIONE DELL'ANEMIA

2.3.1 anemia da disfunzione midollare

2.3.2 anemia da aumentata distruzione degli eritrociti

2-3-3 anemia da aumentata perdita degli eritrociti

2.4 EVOLUZIONE DELLE CAUSE DA ANEMIA

CAPITOLO 3 : parte sperimentale

3.1 OBIETTIVO DELLA TESI

3.2 MATERIALI E METODI

3.4 RISULTATI

3.5 DISCUSSIONI

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

La Leishmaniosi è una malattia infettiva a carattere zoonosico, ad interessamento sistemico ed evoluzione generalmente cronica, causata da protozoi del genere *Leishmania*. La malattia è diffusa in maniera indiretta attraverso la puntura di un insetto ematofago, appartenente al genere *Phlebotomus* (1). Anche se più rare esistono vie di trasmissione diretta della patologia: sono state segnalate sia la trasmissione transplacentare(2) che quella venerea (3) ed è stata confermata la trasmissione mediante trasfusione di sangue(4). E' utile sottolineare che le vie di trasmissione diretta, allo stato attuale, non sembrano particolarmente rilevanti nella diffusione dell'infezione.

Questa patologia parassitaria infetta una grande varietà di vertebrati: è stata segnalata in diversi roditori selvatici e sebbene raramente in numerosi mammiferi: bovino, pecora, capra, cavallo, pony, sciacallo, orso, cammello, scoiattolo del Marocco, volpe (5) e gatto (6), ma i **cani** costituiscono il serbatoio principale di questa zoonosi(6)(7). Nell'uomo la malattia si esprime con una sintomatologia abbastanza polimorfa che consente la distinzione in tre forme cliniche: la forma viscerale (forma viscerale zoonotica ZVL, i cani ne rappresentano il serbatoio), la forma cutanea LC e mucocutane LMC (8).

La malattia a diffusione cosmopolita, è stata segnalata in 88 paesi diversi. In Italia, la malattia considerata tradizionalmente endemica nel territorio dei paesi che affacciano sulla costa tirrenica (9)(10)(11) si è dimostrata presente anche in zone del Nord Italia fino a pochi anni fa ritenute indenni (12)(13), la presenza di nuovi foci in Italia, secondo alcuni autori, sembra essere collegata a fattori climatici che influenzano la biologia del vettore e al trasporto di cani infetti da regioni endemiche ad aree indenni, incluso città dove i vettori della *Leishmania* già esistono. Nelle aree endemiche inoltre a causa delle specifiche esigenze ambientali del vettore, la Leishmaniosi presenta una distribuzione cosiddetta a "macchia di leopardo" caratterizzata dall'alternarsi di microfocoli ad alta e bassa prevalenza di infezione. Il diverso andamento epidemiologico dipende anche dalla capacità vettoriale della specie di flebotomo presente in quell'area. infatti nelle zone con una frequenza di infezione bassa predomina la specie *P. perfiliewi* su *P. perniciosus*, vettore più competente per *L. infantum*.

Leishmania infantum è un parassita intracellulare, che si localizza e moltiplica all'interno delle cellule del sistema reticolo-endoteliale, determinando l'insorgenza della Leishmaniosi canina (CanL)

CanL è una patologia caratterizzata da progressione cronica di segni viscerocutanei che si manifestano in poco più del 50% dei cani infettati. La presenza, l'aspetto e la gravità dei segni clinici dipendono dalla risposta immunologica del cane e dalle fasi della malattia. I segni più comuni sono aumento di volume dei linfonodi, lesioni cutanee, perdita di peso, anemia, lesioni oculari ed insufficienza renale (14). Le principali alterazioni dei parametri di laboratorio includono aumento dell'immunoglobulina sierica, come conseguenza dell'attivazione delle cellule B policlonali, accompagnato dall'inversione del rapporto albumine/globuline, moderata neutrofilia, alti livelli dei parametri renali e proteinuria (15). Vengono, inoltre, frequentemente riscontrati una moderata anemia normocitica/normocromica con bassi livelli di eritrociti, ematocrito (HCT) ed emoglobina (Hgb) (14).

Parte Generale

CAPITOLO 1

Note generali sulla leishmaniosi

1.1 AGENTE EZIOLOGICO

Per leishmaniosi intendiamo un gruppo di infezioni causate da protozoi del genere *Leishmania* con presentazione clinica estremamente variabile. A questo genere appartengono diverse specie e ceppi di parassiti endocellulari che compiono il loro ciclo biologico all'interno di due ospiti:

- a) un invertebrato, il flebotomo, che rappresenta il vettore della malattia (ospite intermedio);
- b) un mammifero, nel quale il parassita si localizza all'interno delle cellule del sistema reticolo-endoteliale (ospite definitivo)(16).

La *Leishmania* assume due forme differenti all'interno dei due ospiti:

nell'ospite intermedio, localizzato a livello del canale alimentare, il parassita si presenta come promastigote, forma flagellata mobile, delle dimensioni di circa 10-20 μm , con corpo stretto e lungo. (fig.1)

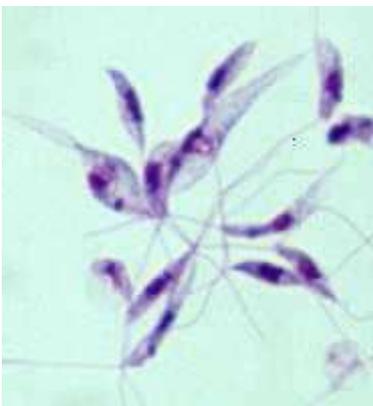


fig 1 Leishmania Infantum: promastigote

Nell'ospite definitivo, invece il protozoo assume la forma di amastigote (fig.2), corpuscolo rotondo, delle dimensioni di 2-5 μm , dotato di un grosso nucleo sferico centrale o eccentrico, adiacente a esso, di un kinetoplasto a bastoncino e in prossimità di quest'ultimo è presente il rizoplasto ovvero l'abbozzo di flagello che non si estende oltre il margine cellulare.(16).

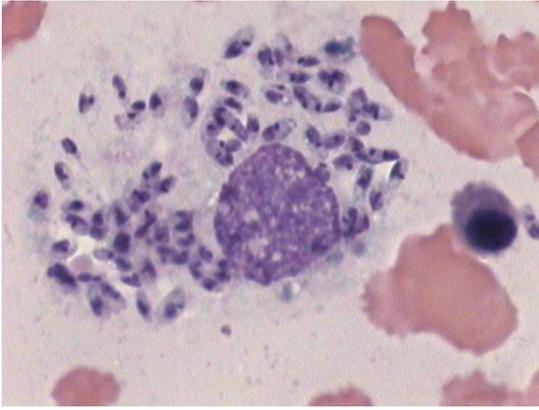


fig 2 *L. Infantum* amastigote all'interno di un macrofago

1.1.1 classificazione del parassita

I protozoi del genere *Leishmania* (17) appartengono al phylum *Sarcomastigophora*, ordine *Kinetoplastida*, famiglia *Trypanosomatidae*, genere *Leishmania*, sottogeneri *Leishmania* (Vecchio e Nuovo Mondo) e *Viannia* (Nuovo Mondo).

Le Leishmanie comprendono organismi per la maggior parte indistinguibili dal punto di vista morfologico e ultrastrutturale, per i quali a tutt'oggi non è stata dimostrata una riproduzione sessuata.

La classificazione in specie e sottospecie in passato problematica vista la somiglianza morfologica delle leishmanie, oggi è basata sulle caratteristiche estrinseche del parassita (comportamento nell'insetto vettore nell'ospite vertebrato e in coltura, manifestazione clinica nell'uomo e negli animali).

Classificata in base alle forme cliniche di leishmaniosi umana, a seconda degli organi e distretti coinvolti e della virulenza del parassita, oltre che dall'assetto immunoreattivo dell'organismo ospite, la leishmaniosi si distingue in:

- *leishmaniosi viscerale* nella quale il protozoo invade il sistema reticolo-endoteliale di tutto l'organismo. E' una malattia a decorso fatale se non trattata;
- *leishmaniosi cutanea* nella quale l'invasione da parte del parassita è limitata alla cute intorno alla porta d'entrata costituita dalla puntura della femmina ematofaga dell'insetto vettore. Questa forma comprende una vasta gamma di malattie, da quelle a lesione singola autorisolvente a quelle a lesione multipla;
- *leishmaniosi muco-cutanea* nella quale una lesione cutanea mostra la tendenza ad una disseminazione massiva delle mucose e cartilagini facciali, senza coinvolgimento viscerale.

Le prime due forme sono distribuite nel Vecchio e Nuovo Mondo mentre la terza forma è prevalentemente limitata alle Americhe.

Per quanto riguarda il cane, anche se il quadro clinico caratteristico ha portato nel passato a separare una forma cutanea da una forma viscerale oggi entrambe sono considerate forme evolutive della medesima malattia indicata con il nome di Leishmaniosi canina generalizzata(1).

La classificazione di Zuckerman e Lainson (1977) considera invece non solo il quadro patologico nell'uomo ma anche la distribuzione geografica raggruppando così le leishmanie in quattro complessi:

- *L. donovani*: parassita che causa prevalentemente la forma viscerale nel Vecchio e Nuovo Mondo;
- *L. tropica*: presente anch'essa nel Vecchio e Nuovo Mondo con forme cutanee;
- *L. mexicana*: raggruppa le leishmanie a tropismo cutaneo del continente americano;
- *L. brasiliensis*: parassita responsabile della forma mucocutanea presente nel Nuovo Mondo.

Attualmente la tassonomia di *Leishmania* ha subito profonde modifiche grazie a nuove tecnologie mediante le quali sono stati definiti i cosiddetti caratteri intrinseci del parassita (isoenzimi, DNA, proteine, antigeni). Tra queste, la metodica standard è costituita dall'analisi elettroforetica degli isoenzimi che permette di raggruppare le leishmanie in zimodemi, cioè in insieme di ceppi mostranti identica mobilità elettroforetica per gli enzimi esaminati (in genere un minimo di 12). Esistono due principali sistemi di codifica degli zimodemi:

- il codice MON, attribuito dal Laboratoire d'Ecologie Médicale di Montpellier-Francia e utilizzato in tutti i paesi dell'area mediterranea;
- il codice LON adottato dalla London School of Hygiene and Tropical Medicine di Londra-Gran Bretagna (attualmente superato).

Nel 1990 Rioux *et al.* hanno proposto una nuova classificazione di *Leishmania* basata sui caratteri isoenzimatici.

Il genere è suddiviso in due sottogeneri comprendenti otto complessi genetici e tredici diverse specie di interesse umano:

a) Sottogenere *Leishmania* (17):

Complesso *L. donovani*, specie: *L. donovani* e *L. archibaldi*;

Complesso *L. infantum*, specie: *L. infantum*;

Complesso *L. tropica*, specie: *L. tropica*;

Complesso *L. major*, specie: *L. major*;

Complesso *L. aethiopica*, specie: *L. aethiopica*;

Complesso *L. mexicana*, specie: *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*;

b) Sottogenere *Viannia* (Lainson e Shaw, 1987):

Complesso *L. braziliensis*, specie: *L. braziliensis* e *L. peruviana*;

Complesso *L. guyanensis*, specie: *L. guyanensis* e *L. panamensis*.

1.1.2 Organizzazione del genoma

I protozoi appartenenti all'ordine *kinetoplastida* presentano un DNA genomico (DNA_g), localizzato all'interno del nucleo cellulare, deputato alla moltiplicazione del parassita, ed un DNA extragenomico, chiamato DNA del kinetoplasto (DNA_k), situato all'interno dell'unico mitocondrio presente, che si divide indipendentemente. Inoltre nel genoma sono stati identificati anche elementi genetici circolari, costituiti da coppie multiple dei geni che codificano gli enzimi bersaglio di alcuni farmaci: essi sono il risultato di processi di amplificazione del genoma a partire da un cromosoma di origine e si formano in risposta alla pressione esercitata da alcuni farmaci, permettendo lo sviluppo della resistenza nei confronti degli stessi(18).

Leishmania è un parassita diploide, asessuato, e possiede un genoma costituito da 34 – 36 cromosomi. In particolare, *L. infantum* ha un genoma con 36 cromosomi (18), i quali possiedono un dominio centrale conservato ed estremità polimorfiche, o regioni telomeriche, formate da sequenze ripetute che non si condensano durante il ciclo mitotico; ciò impedisce lo studio di questi cromosomi mediante studi convenzionali. Tra le due zone del cromosoma esiste una regione subtelomerica che interviene nel processo di segregazione cromosomica ed ha interesse tassonomico.

Kinetoplasto: E' una struttura localizzata all'interno del mitocondrio dei protozoi appartenenti all'ordine *Kinetoplastida*. E' costituito da un disco, visibile al microscopio ottico, che contiene 10 7 paia di basi di DNA mitocondriale o DNA_k (19). Gli si attribuisce la stessa funzione del DNA mitocondriale degli altri sistemi cellulari, come contenere i geni che codificano gli RNA ribosomiali e alcune proteine mitocondriali.

Variazione della struttura proteica: Il passaggio da promastigote ad amastigote è una condizione di stress per il parassita che prevede un drastico cambiamento morfologico, la conseguente induzione

di nuove proteine strutturali e la sostituzione di altre (20). Tra queste in particolare le proteine ribosomiali che intervengono nei processi di sintesi proteica ed inducono la risposta umorale: la famiglia degli istoni, importanti nell'organizzazione e funzionamento del DNA nucleare, e che vengono riconosciute dagli anticorpi che si sviluppano in soggetti affetti da forme di leishmaniosi umana e in caso di leishmaniosi canina; le chinesine (es K39) che agiscono come "motori" del parassita e sono anch'esse responsabili di indurre una forte risposta umorale; la proteina omologa dei recettori dalle chinasi C attivata (LACK) che interviene in numerose funzioni cellulari; proteine antiossidanti, etc. Di notevole interesse sono le proteine di shock termico (heat shock proteins-hsp), in quanto rappresentano la chiave nel processo di adattamento del parassita ai diversi ambienti e rivestono un ruolo centrale nella virulenza del parassita. I geni che regolano l'espressione proteica hsp sono influenzati dalla variazione della temperatura all'interno dell'insetto poichilotermico (tra 22 e 28°C) e nell'ospite vertebrato omotermico (37°C). Alcune proteine maggiori, come hsp60, hsp70, hsp83, vengono sintetizzate durante stress termici ma, a partire da 42°C, la loro sintesi si interrompe definitivamente. Lo shock termico non è l'unico meccanismo che provoca l'espressione delle proteine HSP in quanto possono intervenire altri fenomeni come la stessa fagocitosi del parassita all'interno del macrofago. La rapida espressione delle proteine HSP e la concentrazione relativamente elevata all'interno del macrofago, suggerisce la loro partecipazione nella patogenesi della malattia.

1.1.3 Vettore

I vettori sono insetti ematofagi, appartenenti alla famiglia delle *Psychodidae*. Tra i vari generi presenti in questa famiglia, due sono di interesse veterinario: il genere *Lutzomyia* nel nuovo mondo e il genere *Phlebotomus* nel vecchio mondo. Delle circa 800 specie o sottospecie di flebotomi, 80 sono state provate o sospettate di essere vettori delle 22 specie di *Leishmania* che causano la malattia nell'uomo. Ma poiché in alcuni focolai di leishmaniosi i vettori restano sconosciuti, sicuramente altre specie saranno aggiunte alla lista(21). Le specie presenti in Italia appartengono al genere *Phlebotomus* e sono: *P. perniciosus*, *P. major*, *P. papatasi*, *P. perfiliewi*, *P. sergenti*, *P. ariasi* e *P. mascitti*. Queste specie vivono usualmente in ambienti collinari ad una altitudine compresa tra i 100 e gli 800 metri sul livello del mare e sono attivi solo durante i mesi estivi. *P. papatasi*, specie strettamente endofila e antropofila aveva subito una forte riduzione in seguito alle campagne antimalariche ma recentemente è ricomparso in diverse località. *P. perfiliewi* è il vettore più probabile della leishmaniosi cutanea e la sua distribuzione interessa tutte le regioni del centro sud della penisola. *P. major* è il più importante vettore della malattia nell'area del Gargano(16). *P. perniciosus* è largamente presente nella penisola italiana, soprattutto in Sardegna, Puglia, Sicilia e

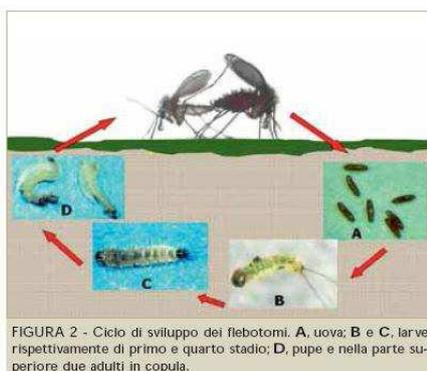
Toscana, predilige le aree rurali e periurbane, raramente le urbane ed è ugualmente adattabile in ambiente domestico, peridomestico e selvatico. Il suo ruolo come vettore è stato provato dall'isolamento di promastigoti di *L.infantum* zimodema MON 1 in molti paesi del bacino mediterraneo e dello zimodema MON 72 nell'area vesuviana (22).

I flebotomi sono insetti molto piccoli, chiamati in gergo pappataci, con corpo lungo 2 – 4 mm; hanno un aspetto irsuto, in quanto le lunghe antenne e le ali sono ricoperte da piccoli peli e queste ultime, a riposo sono tenute erette rispetto al corpo; inoltre, essendo lanceolate, sono adatte ad un volo silenzioso. I parassiti presentano inoltre un colore giallo pallido, occhi grandi e neri e lunghi arti simili a trampoli. Le parti buccali, corte e tozze, sono rivolte verso il basso e adattate a pungere e succhiare (23). Mentre i maschi si nutrono di succhi vegetali, le femmine pungono la cute per nutrirsi di sostanze organiche degli ospiti (determinando irritazione) e per questo hanno strutture buccali adatte a perforare la pelle (24).

Il pasto di sangue delle femmine si compie generalmente durante le ore notturne, con picchi intorno alla mezzanotte ed un'ora prima del sorgere del sole; si parla anche di un picco immediatamente dopo il tramonto (21).

Il volo dei flebotomi è molto silenzioso e di breve durata ed estensione; la massima distanza registrata è stata infatti di 2,3 km (25).

I flebotomi depongono le loro uova nelle crepe dei muri e nelle anfrattuosità del terreno. Ad ogni ovodeposizione possono essere rilasciate più di 100 uova di forma ovoidale lunghe 0,3-0,4 mm e di colore bruno o nero. Le uova per svilupparsi hanno bisogno di elevata umidità ambientale e possono schiudere in 1- 2 settimane in condizioni ottimali ma questo periodo può prolungarsi sensibilmente in relazione alle condizioni ambientali. Le larve alla nascita somigliano a piccoli bruchi; scavano gallerie nella materia organica in decomposizione (residui vegetali) e possono sopravvivere anche quando sono sommerse dall'acqua. Gli stadi larvali sono quattro, seguiti da una forma pupale e infine da quella adulta; gli adulti emergono dal pupario dopo 1-2 settimane e l'intero ciclo dura 30 - 100 giorni o anche più a seconda delle condizioni ambientali, superando anche i mesi invernali (1).



Le zone costiere (fino a seicento metri d'altezza) con clima caldo-umido sono quelle in cui il rischio è maggiore, in quanto i flebotomi trovano le migliori condizioni per sviluppo e sopravvivenza. Lo stesso vale per l'intervallo compreso tra maggio e novembre.

Solo le femmine sono ematofaghe e pungono durante le ore notturne mentre nel corso della giornata rimangono a riposo nelle zone ombreggiate. I loro spostamenti in volo sono generalmente limitati, il che comporta che il rischio di puntura sia elevato soprattutto nelle aree limitrofe agli ambienti idonei al parassita.



Figura 3. Femmina di *Phlebotomus perniciosus* con pasto di sangue.

1.1.4 ciclo biologico

Il ciclo ha inizio quando una femmina di flebotomo (specie *Phlebotomus* nel vecchio mondo e *Lutzomya* nel nuovo mondo), durante il pasto di sangue su un mammifero infetto ingerisce la forma aflagellata della Leishmaniosi. Nel corso di un periodo che varia da 4 a 25 giorni, il parassita continua il suo sviluppo all'interno del flebotomo dove gli amastigoti immobili assunti con il pasto di sangue, si trasformano in promastigoti che si moltiplicano e si sviluppano nel tratto anteriore dell'intestino (26).

Quando un flebotomo parassitato punge un altro ospite vertebrato, inocula nel nuovo ospite la forma finale del promastigote metaciclico. Una volta che il parassita penetra nel derma, viene fagocitato da un macrofago. I macrofagi infetti si andranno a localizzare nel sangue periferico e diffondersi in tutto l'organismo, o nel derma dove potranno essere assunti da un altro flebotomo al momento del pasto in modo da permettere il perpetuarsi del ciclo biologico (21).

1.2 PATOGENESI

Al momento del pasto di sangue, i promastigoti infettanti vengono rigurgitati nel derma del mammifero, ospite definitivo. Le sostanze della saliva dell'insetto contengono potenti vasodilatatori, inibitori della coagulazione del sangue e fattori immuno-modulatori che facilitano l'instaurarsi dell'infezione (27).

Il conseguente maggior afflusso di sangue nella sede in cui si è avuta la puntura dell'insetto, oltre a causare arrossamento e prurito, favorisce il contatto del parassita con i macrofagi.

I promastigoti metaciclici, infettanti, quando sono fagocitati dal macrofago, vengono inclusi in un fagosoma, che poi si fonde con i lisosomi e forma un fagolisosoma, un vacuolo intracitoplasmatico ad azione microbica; in quest'ultimo, però, il protozoo riesce a sopravvivere, in quanto produce dei fattori in grado di inibire gli enzimi deputati a tale azione.

Nella formazione del fagosoma, il promastigote perde il flagello, si trasforma in amastigote e si replica, per scissione binaria, al punto di determinare la rottura del vacuolo prima e della cellula poi. In questo modo gli amastigoti neoformati possono invadere altre cellule del sistema reticolo-istiocitario e, all'interno di queste, possono diffondersi in tutto l'organismo.

La presenza del protozoo nell'organismo recettivo stimola l'attivazione delle difese immunitarie, sia umorali che cellulo-mediate e l'efficienza del sistema immunitario determinerà l'esito dell'infezione.

Le APCs (Antigen Presenting Cells), costituite da macrofagi o cellule di Langherans, una volta fagocitate le leishmanie, le demoliscono e ne processano gli antigeni, che poi espongono in superficie, associati al complesso maggiore di istocompatibilità II (Major Histocompatibility Complex – MHC II), presentandoli ai linfociti T helper CD4+.

In funzione dell'ambiente locale, del tipo di antigene e di altri vari fattori, questi linfociti Th0 vengono stimolati a differenziarsi in linfociti Th1 o Th0. A questo punto inizia a svilupparsi una polarità della risposta(28). Se le APCs producono IL12 si ha l'attivazione dei linfociti Th1 con produzione di INF- γ , IL12 e TNF $-\alpha$ determinano l'attivazione dell'immunità cellulo-mediata e quindi la resistenza alla malattia. Se producono IL1 vengono attivati i linfociti Th2 i con produzione di IL4 che stimola a sua volta la produzione di IL5, IL6, IL10, IL13 e il fattore di stimolazione dei linfociti B che determinano l'attivazione dell'immunità umorale stimolando le plasmacellule a produrre Ac, che però, non essendo protettivi nei confronti del parassita, causano la progressione dell'infezione verso la malattia (5).

Sebbene una certa percentuale prosegua sviluppando la sindrome clinica, alcuni cani sono in grado di eliminare completamente il parassita ed un numero significativo resterà infettato in modo

subclinico(29)(30). Tuttavia lo stato subclinico nei cani sani ma infettati non può essere considerato permanente: alcuni cani manterranno l'infezione per un significativo periodo di tempo, ma fattori quali immunosoppressione e malattie concomitanti possono far progredire l'infezione a malattia clinica(29).

La prevalenza della risposta umorale, non efficace nei confronti del parassita, determina uno squilibrio del sistema immunitario, causando:

-l'opsonizzazione delle Leishmanie, che facilita la fagocitosi macrofagica e incrementa il numero di cellule parassitate;

-iperproduzione anticorpale, che determina ipergammaglobulinemia cronica e che esita nella formazione di:

immunocomplessi circolanti, che possono provocare vasculite, glomerulonefrite, poliartrite, uveite e meningite(21);

Ac diretti contro le strutture proprie dell'organismo, come eritrociti e piastrine, responsabili di lesioni organiche e tissutali;

l'insorgere di uno stato immunopatologico caratterizzato da immunodepressione.

1.3 ESAME CLINICO

1.3.1 Segnalamento

Tutte le razze sono sensibili, tuttavia alcune razze come il Rottweiler, Cocker Spaniel, Pastore tedesco, Boxer, sembrano essere predisposte sembrano essere più sensibili allo sviluppo di malattia sintomatica(32).

Il sesso non sembra essere un fattore di rischio.

La malattia ha una distribuzione bimodale, con un picco nei soggetti di età inferiore a 3 anni e un secondo picco tra gli 8 e i 10 anni (31).

1.3.2 Sintomatologia

Il periodo di incubazione può variare da alcuni mesi fino ad oltre tre anni; per questo motivo, nonostante il contagio si verifichi nei periodi nei quali la concentrazione dei flebotomi è alta, ossia tra maggio e ottobre, le manifestazioni cliniche della leishmaniosi possono comparire in qualsiasi stagione dell'anno.

Il decorso è generalmente subacuto o cronico, anche se nei cuccioli è possibile osservare delle forme acute, con la comparsa di febbre intermittente o remittente e tremori diffusi, che portano a morte il soggetto (33).

Nelle fasi iniziali della malattia, i segni possono essere vaghi; sono caratterizzati infatti da debolezza e intolleranza all'esercizio, lento ma progressivo dimagrimento, lieve o marcata disoressia, e spesso sono accompagnati da lesioni cutanee per lo più di tipo furfuraceo. Inoltre, all'anamnesi, il proprietario riferisce di un soggiorno più o meno prolungato dell'animale in aree endemiche.

Il sistema reticolo-endoteliale è sempre interessato, con coinvolgimento di linfonodi, fegato, milza e midollo osseo. La linfadenomegalia è il sintomo più frequente e può essere sistemica oppure interessare uno o più linfonodi. I linfonodi maggiormente colpiti sono i prescapolari, probabilmente per la loro stretta connessione con i vasi linfatici delle regioni anteriori, dove si osservano con maggiore frequenza le lesioni cutanee. Alla palpazione, i linfonodi si presentano aumentati di volume, non dolenti e di consistenza duro-elastica. L'epatomegalia e la splenomegalia sono invece un reperto meno costante. Dal punto di vista dermatologico è possibile osservare una certa rarefazione del pelo, che può talvolta interessare tutta la superficie corporea. Con il passare del tempo si sovrappongono altre lesioni. Quelle cutanee sono rappresentate da un'alopecia progressiva e simmetrica, con intensa desquamazione secca, che di solito inizia dalla testa e poi si estende al resto del corpo; possono essere presenti anche ulcere localizzate sul naso e sulla pinna auricolare, noduli cutanei o linguai(34), sulle zampe (in corrispondenza delle prominenze ossee), sui cuscinetti plantari, eruzioni di pustole (35)(36), onicogrifosi (reperto piuttosto specifico, che però si nota solo in una piccola percentuale di pazienti) ed eczema furfuraceo. La dermatite furfuracea o amiantacea (dermatite secca esfoliativa) in genere non è pruriginosa.

L'immunodepressione causata dalla leishmaniosi può favorire inoltre lo sviluppo di altre infezioni opportuniste, in particolare la rogna demodettica e le micosi.

Non sono infrequenti anche infezioni combinate con *Ehrlichia*, *Babesia* e *Dirofilaria*, soprattutto se l'infezione da *Leishmania* si verifica nelle regioni in cui anche questi microrganismi sono endemici. Alcuni animali sviluppano lesioni oculari, legate sia all'azione diretta del parassita sia al tipo di risposta immunitaria.

Le mucose si presentano generalmente anemiche, a seguito dell'epistassi monolaterale spesso presente, che può essere dovuta ad una grave forma di trombocitopenia o alle ulcere formatesi sulla mucosa nasale ed a livello delle narici o ad una vasculite da immunocomplessi.

Il deposito di questi ultimi a livello renale determina lesioni a carico del glomerulo, con conseguente instaurarsi di una glomerulo nefrite membrano-proliferativa cronica (15), oppure di

nefriti interstiziali, che si manifestano con poliuria e polidipsia (indicano che il danno renale è di almeno il 75%), edemi discrasici e versamenti cavitari (dovuti soprattutto all'ipoalbuminemia), proteinuria ed innalzamento dei livelli sierici di urea (BUN) e creatinina.

Causa principale della morte dei soggetti affetti da Leishmaniosi è infatti l'insufficienza renale.

Considerando il frequente insorgere di insufficienza renale cronica nei cani malati, ai fini di una corretta gestione del paziente risulta essenziale valutare la funzione renale e stadiare l'eventuale lesione utilizzando le linee guida IRIS - International Renal Interest Society - (che tengono conto di esami urine, emato-biochimici, rilevazione pressione sistemica), in quanto la diagnosi precoce di malattia renale può favorire la prognosi del paziente. Numerosi studi hanno rilevato la presenza di lesioni renali nel 100% dei soggetti esaminati (15), ciononostante l'iperazotemia tipica della compromissione renale non è di frequente riscontro e si manifesta solo con la progressione della patologia, quando la maggior parte dei nefroni risulta danneggiato.

La perdita di peso e l'atrofia muscolare (37) sono i segni più comuni di un coinvolgimento viscerale. Alcuni cani perdono peso nonostante l'appetito vorace, ma la perdita seria della condizione è, di solito, associata ad anoressia e a segni di insufficienza renale, compreso l'ottundimento del sensorio, la poliuria, la polidipsia ed il vomito. Nei casi di malattia conclamata, la diminuzione dell'attività fisica dipende da una riduzione delle resistenze, da sonnolenza e dall'interessamento dell'apparato locomotore, che si manifesta con atrofia muscolare, a partenza dai muscoli temporali e masticatori (che conferisce il tipico aspetto di "cane vecchio"), e con zoppie spesso intermittenti e migratorie causate da polimiositi ed artrosinoviti. Negli ultimi anni, accanto alle forme cliniche tradizionali, sono comparsi quadri nuovi, privi dei sintomi tipici, in cui la sintomatologia patologica è riferibile esclusivamente al coinvolgimento di un organo.

La compromissione renale può, in alcuni casi, rappresentare l'unica alterazione responsabile della sintomatologia(38), oppure talvolta le manifestazioni cliniche possono coinvolgere esclusivamente l'apparato muscolo-scheletrico (zoppia) (39).

Sono state descritte anche forme di leishmaniosi atipiche con sintomatologia esclusivamente enterica (enterite acuta e colite cronica emorragiche)(38), oppure manifestazioni quali il tamponamento cardiaco (35).

Inoltre nei cani è stata suggerita un'augmentata associazione tra leishmaniosi e neoplasia linfoide o emangiosarcoma (40).

1.4 INDAGINI DI LABORATORIO

I cani affetti da Leishmaniosi canina presentano numerose alterazioni emato-chimiche, molte delle quali sono aspecifiche e comuni a molte altre malattie.

Si riscontrano più frequentemente (14)(30):

- ***anemia normocitica-normocromica iporigenerativa***, che è causata da diversi meccanismi patogenetici, fra cui soprattutto l'aumento dell'attività emocateretica da parte del SRE splenico sui globuli rossi opsonizzati da immunocomplessi e la perdita di sangue a partire dalle ulcere; è iporigenerativa per depressione midollare;
- ipergammaglobulinemia, causata dall'iperproduzione di anticorpi, non protettivi nei confronti delle leishmanie;
- iperalfadueglobulinemia, indice di uno stimolo infiammatorio aspecifico o di danno renale;
- iperprotidemia, fino a 13g/l, dovuta all'ipergammaglobulinemia;
- ipoalbuminemia, dipendente da vari fattori, quali enteropatia proteinodisperdente, processi flogistici, diminuita sintesi a livello epatico e aumentata escrezione con l'urina;
- trombocitopenia, spesso presente, conseguente a vasculiti, alterata trombocitopoiesi, aumento della distruzione, insufficienza epatica e/o renale, Ac anti-piastrine;
- riduzione del valore HCT;
- leucocitosi con deviazione a sinistra;
- neutrofilia;
- positività del test di Coombs; _ basso rapporto albumina/globulina, dovuto ai due parametri precedenti;
- creatininemia, indice di filtrazione renale, e uremia aumentate
- aumento degli enzimi epatici (ALT, ALP),
- proteinuria, dovuta all'interessamento renale. Se la compromissione renale è di minore entità, la proteinuria è glomerulare, quindi di tipo selettivo; se l'interessamento renale è grave è, invece, di tipo misto, cioè sia tubulare che glomerulare (41);
- Pu/Cu (rapporto proteinuria/creatinina) >1.

1.5 CLASSIFICAZIONE

In base alle caratteristiche sintomatologiche, alla risposta immunitaria ed alla carica parassitaria in passato si distinguevano 4 classi di soggetti (42):

Asintomatici: nessun segno clinico

Oligosintomatici: da 1 a 3 segni

Sintomatici: più di 3 segni clinici

Spiccatamente sintomatici.

In merito alle recenti acquisizioni, nel 2008 ai fini diagnostici e terapeutici, fu introdotta una nuova classificazione che differenziava i soggetti in sei stadi (Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione parte II: approccio terapeutico Oliva G. et al., 2008):

Stadio A cani esposti

Stadio B cani infetti

Stadio C cani malati

Stadio D cani malati con quadro clinico grave

Stadio E cani malati refrattari o recidivi

Attualmente per un'elaborazione più corretta dei dati, e per cercare di uniformare i risultati ottenuti, i soggetti esaminati sono stati classificati secondo lo status di infezione da *Leishmania infantum* in base ai dati delle indagini parassitologiche (sierologia, PCR, e coltura linfonodale), delle alterazioni clinico-patologiche e dei segni clinici come segue: (Fogliamanzillo et al, 2013)

Negativo nessuna positività alle indagini parassitologiche per *Leishmania infantum*;

Infezione Subpatente positività alla PCR midollare; titolo IFAT $\leq 1/160$; coltura linfonodale negativa, assenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche attribuibili a *Leishmania infantum*;

Infezione Attiva Asintomatica positività alla PCR midollare; titolo IFAT $\geq 1/160$; positività alla coltura linfonodale; assenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche attribuibili a *Leishmania infantum*;

Infezione Attiva Sintomatica positività alla PCR midollare; titolo IFAT $\geq 1/160$; positività alla coltura linfonodale; presenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche causate da *Leishmania infantum*;

1.6 DIAGNOSI

Fare diagnosi di leishmaniosi canina basandosi sulla sola sintomatologia è molto difficile, a causa dell'elevata variabilità dei segni clinici; in più, molti sono comuni anche ad altre patologie; quindi deve essere opportunamente differenziata da altre malattie quali: Erlichiosi, Ricketziosi, Babesiosi, epatozoonosi, linfoma, rogna sarcoptica e demodettica, dermatiti allergiche alimentari, da pulci o atopica.

Per la diagnosi sperimentale è necessario effettuare delle indagini specifiche (44).

Esami specifici: consentono di ottenere la diagnosi di leishmaniosi in maniera definitiva e possono essere:

- indiretti (prove sierologiche) per evidenziare la presenza di anticorpi anti-*leishmania* nel siero dell'ospite;
- diretti (microscopici, colturali, prove biologiche, tecniche di PCR).

Si tratta di esami definitivi solo quando il risultato è positivo, mentre se questo è negativo non si può escludere l'infezione, in quanto il parassita potrebbe non essere rilevabile se presente in numero esiguo nell'animale infetto.

Una certa percentuale di soggetti infetti può negativizzarsi ad alcuni dei test diagnostici, dopo un periodo generalmente breve dal primo riscontro positivo e senza aver ricevuto terapia.

Non è noto, in realtà, se questi soggetti si siano liberati dall'infezione, abbiano contenuto l'infezione ad un livello tale che essa non risulti più rilevabile con il metodo utilizzato o se il parassita si sia localizzato in tessuti diversi da quelli esaminati in sede di prima diagnosi (42).

1.6.1 Metodi cito-istologici

Esame citologico: il metodo permette di evidenziare la presenza di amastigoti all'interno di macrofagi o in sede extracellulare. Quando il campionamento avviene a livello di organi lesionati si osservano alterazioni compatibili con Leishmaniosi (flogosi linfoplasmacellulare e/o granulomatosa-piogranulomatosa, iperplasia reattiva linfonodale, iperplasia mieloide e/o ipoplasia eritroide nel midollo osseo, ecc.).

L'indagine citologica andrebbe quindi eseguita sui seguenti campioni:

-midollo osseo e linfonodi in presenza di segni clinici o alterazioni clinico-patologiche riferibili ad un loro interessamento (anemia, linfadenomegalia, ecc.);

-lesioni cutanee papulari, nodulari e ulcerative

-altre sedi: fluidi biologici prelevabili da sedi con lesioni (ad es. liquido sinoviale in caso di artrite/poliartrite, liquido cefalorachidiano in caso di segni neurologici, ecc.).

In assenza di lesioni campionabili, gli organi o tessuti in cui più facilmente si possono riscontrare parassiti sono rappresentati, in ordine decrescente di sensibilità diagnostica, da midollo osseo, linfonodo e milza, sangue.

Esame istologico: per l'evidenziazione del parassita e delle alterazioni compatibili con leishmaniosi canina

Sono metodiche molto specifiche in quanto si basano sull'osservazione diretta del parassita, ma poco sensibili per la possibilità di diagnosticare falsi negativi. L'impiego di anticorpi monoclonali e delle tecniche di immunostochimica, permette l'identificazione selettiva dei parassiti anche in campioni con pochi parassiti, aumentando quindi la sensibilità di questi metodi.

1.6.2 metodi parassitologici

Esame culturale. È il test più specifico perché lo sviluppo in coltura di promastigoti vitali è unicamente ascrivibile al genere *Leishmania*. Ha però lo svantaggio di richiedere tempi lunghi d'esecuzione ed è eseguito solo presso laboratori specializzati di alcuni Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

1.6.3 metodi molecolari

Polymerase chain reaction (PCR): la tecnica permette di amplificare sequenze specifiche del genoma di *Leishmania*. È un metodo molto sensibile, è in grado di identificare piccolissime quantità di DNA dei protozoi presenti nel materiale biologico esaminato. può essere eseguita su diversi campioni biologici. Oltre ai tessuti lesionati, in caso d'infezione generalizzata gli altri tessuti che forniscono le maggiori probabilità di identificare mediante PCR il DNA degli eventuali parassiti presenti sono, in ordine decrescente di sensibilità: midollo/linfonodo, cute, congiuntiva, *buffy coat*, sangue periferico. Va però ricordato che, nei cani resistenti, l'inoculazione di *Leishmania* può non essere seguita da disseminazione del parassita, quindi un'eventuale positività cutanea in assenza di lesioni cutanee in area endemica non significa necessariamente che il cane sia infetto e sviluppi infezione e allo stesso modo, eventuali positività midollari possono poi essere seguite da negativizzazione. In linea di massima, è sempre meglio utilizzare materiale fresco o congelato o fissato in alcol etilico al 95%.

1.6.4 metodi sierologici

Nel giro di qualche mese dall'infezione, in media 5 mesi (intervallo: 1-22) per le infezioni naturali e 3 (intervallo: 1-6) per le infezioni sperimentali, si assiste alla sierconversione.

Solo nei cani con disseminazione del parassita i titoli anticorpali tendono a risultare elevati o in aumento.

Le tecniche diagnostiche disponibili sono diverse. Alcune, come il *Western Blotting*, pur mostrando ottime prestazioni diagnostiche, non vengono utilizzate su larga scala per ragioni di tempi di esecuzione e di costi. Quelle più ampiamente disponibili sono rappresentate dai test di immunomigrazione rapida, dalle tecniche ELISA e dall'immunofluorescenza indiretta (IFAT):

Immunomigrazione rapida: È di facile esecuzione e si può eseguire anche in strutture ambulatoriali, ma ha un'efficienza diagnostica inferiore rispetto alle tecniche ELISA e IFAT: la specificità è medio-alta ma la sensibilità è bassa e può quindi fornire risultati falsi negativi.

Nel caso di risultato positivo il limite risiede nel fatto che il test non consente di valutare il titolo anticorpale, che può invece essere utile nell'identificare i soggetti con disseminazione del parassita e nel monitorare la risposta terapeutica.

Test ELISA è un test specifico e ha sensibilità medioalta. Inoltre permette di quantificare gli anticorpi specifici.

Il siero in esame è posto in micropiastre rivestite di antigeni di *Leishmania*. In caso di positività, si apprezza una reazione colorimetrica quantificabile spettrofotometricamente e quindi non soggetta a variabili legate all'operatore.

IFAT la sensibilità e specificità dell'I FAT sono prossime al 100% per questo viene considerato dall'Organizzazione Internazionale delle Epizoozie (OIE) il metodo sierologico di riferimento.

Il test IFAT viene eseguito ponendo il siero in esame su vetrini su cui sono presenti promastigoti di *Leishmania*. Gli anticorpi eventualmente presenti si legano ai promastigoti e la positività viene evidenziata utilizzando anti-anticorpi fluorescenti. In questo caso è anche possibile determinare il titolo anticorpale utilizzando diluizioni seriali del siero in esame.

La determinazione del titolo anticorpale permette di differenziare i cani infetti ma non malati, che avranno tendenzialmente un titolo basso, da quelli malati e con disseminazione del parassita, che avranno un titolo tendenzialmente elevato.

La definizione di titolo "basso" o "elevato" va sempre rapportata alle soglie di positività riportate dal laboratorio di riferimento (46).

1.7 TERAPIA

I farmaci attualmente impiegati nel trattamento della Leishmaniosi canina consentono un buon recupero clinico ma non evitano le ricadute che possono presentarsi a distanza variabile di tempo. (Baneth GH "Chemotherapy of canine leishmaniosis" Veterinary Parasitology 2002 106: 315-24)

I discreti successi sono imputabili a diverse cause:

- un profondo squilibrio immunitario che si manifesta in corso d'infezione;
- la difficoltà di interazione farmaco-bersaglio (la presenza di cellule parassitate in distretti poco vascolarizzati come cute, tessuti cheratinizzati, ecc., rende problematico il raggiungimento di concentrazioni intracellulari terapeuticamente efficaci);
- l'esistenza di ceppi resistenti ai chemioterapici antimoniali.

Prima di iniziare la terapia va valutato (47):

- il grado di compromissione clinica del soggetto,
- la funzionalità epato-renale (è necessaria per la corretta scelta del farmaco, per l'emissione di un giudizio prognostico e per l'istituzione di una terapia di supporto);
- la carica parassitaria (aspirato linfonodale e midollare per quantificare la carica parassitaria prima e dopo i trattamenti);
- lo stato immunitario dell'animale (tipo di risposta innescata Th1- Th2).

composti antimoniali

L'Antimoniato di N-metilglucammina è l'unico farmaco a base di Antimonio pentavalente (Sbv) utilizzato in Europa sia nel cane che nell'uomo.

In Italia è disponibile una formulazione per uso veterinario. Il meccanismo d'azione del farmaco, non ancora del tutto chiarito, sembra legato all'inibizione di alcuni enzimi della glicolisi del parassita, fosfofruttochinasi e deidrogenasi piruvica. L'emivita del farmaco nel cane è breve non dà fenomeni d'accumulo e per tale motivo è poco tossico. La via di escrezione del farmaco è principalmente renale e avviene nell'arco di 6-9 ore dopo la somministrazione. La buona efficacia clinica del farmaco è descritta in tutti i lavori nei quali è stato impiegato. La riduzione dei segni clinici si osserva in un intervallo di tempo compreso tra pochi giorni ed alcune settimane.

Il miglioramento clinico è quasi sempre accompagnato dalla normalizzazione dei parametri dell'emogramma e del profilo biochimico, alcune volte più lenta rispetto al quadro clinico. Inoltre il trattamento spesso induce una diminuzione dei titoli anticorpali. L'effetto collaterale dell'Antimoniato di N-metilglucammina più frequentemente descritto è l'istolesività nel sito di inoculo, specialmente quando il farmaco è somministrato in unica dose giornaliera con volumi superiori ai 2-3 ml. Vengono segnalati, inoltre, rari episodi transitori di anoressia, diarrea e febbre. Tra le alterazioni dei parametri di laboratorio vanno segnalati aumenti transitori delle transaminasi e

dell'amilasi. Il ruolo del farmaco nel possibile peggioramento della funzionalità renale del cane affetto da leishmaniosi non è chiaro. Probabilmente, l'uso del farmaco in soggetti con gravi disfunzioni renali non è in grado di determinare un miglioramento della funzionalità renale. Da segnalare anche la descrizione di un episodio di pancreatite acuta.

Il dosaggio più frequentemente utilizzato nei lavori consultati è quello di 100 mg/kg SID sc per un periodo di 4 settimane.

allopurinolo

L'Allopurinolo è un composto analogo dell'ipoxantina che interferisce con la sintesi dell'acido urico attraverso il blocco della xantina-ossidasi. La sua attività anti-*Leishmania* è dovuta al fatto che le leishmanie, come altri emoflagellati, sono incapaci di sintetizzare le purine, per cui devono necessariamente recuperare le basi azotate ed i nucleosidi dall'ospite ("purine salvage pathway").

L'Allopurinolo, una volta incorporato dal parassita, dà luogo ad alcuni composti tossici che ne determinano la morte. Nel cane, quando somministrato in monoterapia, per periodi non inferiori a 2-3 mesi, l'Allopurinolo determina quasi sempre un miglioramento clinico ed in parte dei parametri di laboratorio. Analogamente all'Antimoniato di N-metilglucamina, il farmaco, pur riducendo la carica parassitaria, non determina la guarigione parassitologica, come dimostrato anche dalle recidive pressoché costanti dopo poco tempo dalla sospensione della terapia. Il dosaggio dell'Allopurinolo riportato nei lavori nei quali il farmaco è stato utilizzato da solo varia da 5 mg/kg SID po a 20 mg/kg BID po per periodi variabili da 2 a 24 mesi.

L'Allopurinolo dimostra un'ottima maneggevolezza, anche quando somministrato per periodi molto lunghi (1-2 anni). Ha pochi effetti collaterali, tra i quali, l'iperxanturia che può produrre urolitiasi (Bartges et al., 1995).

Associazione Antimoniato di N-metilglucamina/Allopurinolo

L'associazione tra i due farmaci è il protocollo più utilizzato nella terapia della leishmaniosi del cane. Come dimostrato da Denerolle e Bordoiseau, i soggetti trattati con la combinazione dei due farmaci hanno una remissione più duratura se paragonata a quella ottenuta con l'utilizzo delle due sostanze in monoterapia. Un altro dato interessante è la buona tollerabilità di tale associazione farmacologica.

Nella pratica il protocollo più frequentemente utilizzato è quello che prevede l'uso di Antimoniato di N-metilglucamina alla dose di 100 mg/kg SID sc (o 50 mg/kg BID sc) per uno-due mesi, unitamente alla somministrazione di Allopurinolo alla dose di 10 mg/kg BID po, da protrarre per molti mesi (alcuni Autori considerano la possibilità di somministrare a vita il farmaco)

dopo la remissione clinica. Anche l'associazione Antimoniato di N-metilglucamina e Allopurinolo, pur utilizzata per lunghi periodi, non determina la guarigione parassitologica. Le recidive sono possibili nonostante il protrarsi della terapia.

Amfotericina B

L'Amfotericina B è un antibiotico polienico prodotto dallo *Streptomyces nodosus*, largamente impiegato nella terapia delle micosi sistemiche. Il meccanismo d'azione del farmaco nei confronti di *Leishmania* spp, sovrapponibile a quello esibito contro i miceti, si traduce in un'inibizione dell'ergosterolo, principale sterolo di membrana sia delle leishmanie che dei funghi, con conseguente formazione di alterazioni strutturali della membrana cellulare e morte dei parassiti. L'utilizzazione del farmaco, pur assicurando risultati soddisfacenti nella maggior parte degli animali trattati, è limitata dalla non facile preparazione e somministrazione dagli effetti collaterali (nefrotossica, può determinare anche febbre, vomito, anoressia e periflebiti) e dalla mancata sterilizzazione dei cani trattati. Il problema della tossicità dell'Amfotericina B è stato di recente quasi del tutto superato con la messa a punto di nuove preparazioni farmaceutiche ad uso umano che prevedono l'incorporazione dell'antibiotico in complessi lipidici. I cani trattati mostrano un miglioramento clinico senza eliminazione, però, completa del parassita. L'OMS sconsiglia l'impiego del farmaco nel cane, allo scopo di evitare l'insorgenza di ceppi resistenti al principio attivo.

Amminosidina

L'Amminosidina è un antibiotico amminoglicosidico prodotto da *Streptomyces chrestomiceticus*, dotato di un ampio spettro di attività antibatterica, comprendente Gram+, Gram- ed acido resistenti, nonché micoplasmi ed alcuni protozoi. Il meccanismo d'azione dell'Amminosidina nei confronti di *Leishmania* spp. sembra essere identico a quello descritto nei confronti dei batteri: il contatto tra il farmaco ed il microrganismo sensibile comporta la formazione di una proteina carrier di membrana grazie alla quale l'antibiotico riesce a raggiungere elevate concentrazioni intracellulari, con successiva interazione con i ribosomi e conseguente anomala trascrizione di proteine. Nel cane i fenomeni tossici, quasi sempre reversibili e comuni agli altri amminoglicosidi, sono conseguenti all'accumulo dell'antibiotico nella perilinfia e nell'endolinfia dell'orecchio interno nonché nelle cellule del tubulo renale prossimale, con conseguente possibile alterazione dei parametri della funzionalità renale ed interessamento dell'VIII paio di nervi cranici. Appaiono interessanti i risultati ottenuti nella terapia della leishmaniosi canina, sia con l'impiego della sola Amminosidina che con l'associazione Amminosidina - Antimoniato di N-metilglucamina. I soggetti trattati con Amminosidina hanno mostrato buoni miglioramenti clinici e riduzione della carica parassitaria. Lo studio di Oliva et al.²⁴

ha dimostrato che il protocollo che prevede l'associazione di Amminosidina (5,25mg/kg BID sc) e di Antimoniato di N-metilglucamina (60mg/kg SID sc) per 28 gg è da preferire alla ionoterapia per il maggior numero di soggetti guariti clinicamente, il minor numero di recidive, la riduzione della carica parassitaria sia midollare che linfonodale e per la significativa riduzione del titolo anticorpale.

Pentamidina

La Pentamidina è un composto diamminico dotato di notevole attività antiprotozoaria ed antifungina. Il suo meccanismo d'azione è poco conosciuto, sebbene sia dimostrato sia in grado di causare danni al DNA del kinetoplasto ed al complesso mitocondriale dei parassiti. Può causare numerosi effetti collaterali acuti (ipotensione, nausea, vomito, scialorrea, diarrea, shock anafilattico) e cronici (ipoglicemia, diabete, danni epato-renali, trombocitopenia). Somministrata per via intramuscolare, inoltre, la Pentamidina isotionato, forma salina normalmente presente nelle preparazioni in commercio, è fortemente istolesiva, tanto da provocare la formazione di ascessi nel punto di inoculo. Rhalem e coll.

Spiramicina/Metronidazolo

E' stato dimostrato che il metronidazolo possiede un'attività contro *Leishmania* spp. *in vitro*. I risultati ottenuti hanno dimostrato un buon miglioramento clinico e degli esami di laboratorio.

Enrofloxacin

I chinoloni inibiscono l'enzima batterico DNA-girasi, responsabile del superavvolgimento del DNA, con conseguente alterazione dell'orientamento spaziale del DNA e conseguente attività battericida. Una similitudine biochimica analoga a quella batterica è presente nella struttura genomica di alcuni Tripanosomi e l'attività dei chinoloni potrebbe, quindi, interferire anche sulla replicazione del DNA di alcuni protozoi. È presente un solo trial clinico sull'utilizzo dell'Enrofloxacin in corso di leishmaniosi canina dove è stato studiato l'impiego del farmaco da solo o in associazione con Metronidazolo in soggetti naturalmente infetti da *Leishmania infantum*. I gruppi trattati con Enrofloxacin hanno dimostrato un parziale e poco duraturo miglioramento clinico ed anche gli Autori del lavoro escludono l'impiego del farmaco per la terapia della leishmaniosi canina.

Domperidone

Il Domperidone, è un antagonista dei recettori D2 della Dopamina. Il Domperidone aumenta la prolattinemia e l'aumento dei livelli ematici di prolattina può migliorare la risposta immunitaria cellulo-mediata. Il farmaco è stato utilizzato al dosaggio di 1 mg/kg BID po per un mese. Il Domperidone si è dimostrato efficace nel controllare e ridurre i segni clinici ed il titolo anticorpale.

I miglioramenti sono stati più evidenti nei soggetti con segni clinici più lievi, nella maggior parte dei cani con sintomatologia più severa si è ottenuto un miglioramento clinico ma non associato a sieronegativizzazione. I buoni risultati clinici sono stati confortati da un significativo aumento della risposta immunitaria cellulare, determinata mediante test intradermico alla leishmanina e test di proliferazione linfocitaria.

Miltefosina

La Miltefosina (esadecil-fosfocolina) è un analogo dei fosfolipidi, la sua attività anti-*Leishmania* è determinata da alterazioni indotte al metabolismo dei fosfolipidi del parassita. L'attività leishmanicida della Miltefosina è stata studiata sia *in vitro* che *in vivo*. I test eseguiti in vitro hanno valutato l'attività del farmaco nei confronti di 6 differenti specie di *Leishmania* ed hanno dimostrato una significativa attività sullo stadio promastigote extracellulare e l'aumento del killing macrofagico nei confronti dello stadio intracellulare amastigote. Studi di farmacocinetica eseguiti su animali di laboratorio e cani, utilizzando la dose di 2 mg/kg BID po per 28 gg (dose attualmente registrata per il cane), hanno dimostrato un assorbimento rapido e completo, una bassa clearance plasmatica, una lunga emivita nei tessuti corporei, un'ampia distribuzione nei tessuti bersaglio, una lenta metabolizzazione epatica in colina e l'assenza di eliminazione per via renale. Studi di tossicità evidenziano che la Miltefosina è ben tollerata ai dosaggi registrati per numerose settimane consecutive, non determina nefrotossicità e che gli effetti collaterali gastroenterici sono dose dipendenti. A causa della sua tossicità sull'apparato riproduttore non dovrebbe essere somministrata a cagne gravide, in lattazione e destinate alla riproduzione. Un recente studio clinico multicentrico ha valutato l'efficacia e la sicurezza dell'associazione Miltefosina e Allopurinolo i risultati hanno mostrato una significativa riduzione dello score clinico, la normalizzazione dei dati di laboratorio e la riduzione della carica parassitaria(47).

1.8 PROFILASSI

L'unico metodo di lotta efficace nei confronti della leishmaniosi è rappresentato dalla prevenzione attraverso interventi mirati sull'ambiente e operando un controllo sul vettore responsabile e sul contatto tra questo e l'ospite. La profilassi ha il duplice obiettivo di prevenire la malattia nel cane (che rappresenta il principale serbatoio) e di salvaguardare la salute umana.

Le azioni fondamentali sono rappresentate da:

-**Profilassi sanitaria ambientale** Si basa su misure igieniche generali preventive atte ad impedire la costituzione di nuovi focolai in cui è possibile lo sviluppo dei flebotomi (discariche, fogne, canali di scarico, siti di stoccaggio, ecc.). Prevede l'esecuzione di frequenti interventi di disinfestazione in quei luoghi in cui è probabile rinvenire dei nidi mediante l'uso di trappole ed insetticidi a base di piretroidi sintetici, e la dotazione delle aperture dei locali di idonee zanzariere a maglie molto fitte (80-100 maglie/cm²), per impedire l'ingresso dei flebotomi nei ricoveri. Infine, è di rilevante importanza evitare l'introduzione di soggetti infetti in aree indenni per evitare la comparsa di nuove sorgenti di malattia.

-**Profilassi sanitaria diretta rivolta ai flebotomi**

Per limitare l'azione di tali insetti è possibile sia utilizzare delle trappole che attraggono il vettore, nelle vicinanze di fonti luminose, sia impiegare degli insetticidi. Al contrario, è impossibile compiere interventi di bonifica delle aree interessate senza considerare le gravi ripercussioni sulla salute umana e animale in genere, e di eventuali dissesti ecologici conseguenti alla loro grande estensione. Il controllo dei flebotomi, basato sull'impiego di insetticidi con ampio effetto residuale, continua ad essere uno dei principali strumenti disponibili nella prevenzione della Leishmaniosi. La ricerca di nuovi prodotti, formulati specificamente per essere applicati sugli animali domestici apre nuove prospettive nella lotta contro la Leishmaniosi canina. Le sostanze maggiormente utilizzate ed efficaci sono i piretroidi sintetici (47).

I principi attivi maggiormente utilizzati sono:

-**DELTAMETRINA**: Sostanza insetticida che agisce su un elevato numero di insetti e sulle forme mobili degli acari, prevalentemente per contatto e secondariamente per ingestione. Ha un forte potere abbattente ed è fotostabile, perciò manifesta una certa persistenza.

Come gli altri piretroidi ha azione neurotossica provocando la paralisi degli insetti in brevissimo tempo.

-**PIRIPROXIFENE**: Insetticida appartenente a base piridinica attivo in particolar modo contro gli artropodi. Il piriproxifene è un regolatore della crescita, con spiccata efficacia nei confronti della mosca bianca, della cocciniglia e delle pulci. Avendo una lunga attività d'azione, è attiva nei processi di metamorfosi, embriogenesi, riproduzione e sviluppo larvale di numerose specie di

insetti. È una molecola che funge da analogo alla neotenina (conosciuta anche come ormone giovanile). Tale ormone regola, nell'insetto, le mute larvali. L'ormone deve essere prodotto in precise quantità durante specifici momenti della vita riproduttiva dell'insetto per evitare che possa condurre alla sua morte. Somministrando il piriproxifene, si creano una serie di squilibri fisiologici ed ormonali che portano alla morte dell'insetto.

-PERMETRINA: è una sostanza attiva antiparassitaria utilizzata come insetticida. Appartiene alla famiglia dei piretroidi ed agisce come neurotossina.

Il sito primario d'azione di tutte e due le classi è a livello dei canali del sodio a livello della membrana cellulare degli elementi eccitabili. Dopo il passaggio di un potenziale d'azione nelle cellule eccitabili del tessuto nervoso e di quello muscolare, le piretrine ed i piretroidi bloccano l'apertura di una certa percentuale dei canali di membrana per il sodio. Questi agenti vengono quindi detti bloccanti dell'apertura dei canali. Normalmente, dopo il passaggio di un potenziale d'azione, l'iniziale flusso di ioni sodio verso l'interno della cellula viene rapidamente ridotto. In presenza di piretrine e piretroidi, invece, si ha il perdurare di un certo afflusso di sodio. Il continuo afflusso di ioni sodio determina dopo il potenziale d'azione primario un prolungamento della corrente. Questo, a sua volta, è causa di ripetute scariche delle cellule eccitabili. Il persistere di tale depolarizzazione inibisce la propagazione di ulteriori potenziali d'azione, quindi la paralisi nervosa. La permetrina elimina acari e zecche al semplice contatto con tessuti trattati. Ha una bassa tossicità per i mammiferi, l'assorbimento attraverso la pelle è limitato e reazioni allergiche sono rare. Viene, quindi, utilizzata anche sui cani per eliminare gli stessi parassiti e per tenere lontano zanzare e flebotomi responsabili della trasmissione della leishmaniosi. La permetrina non va assolutamente utilizzata sui gatti, in quanto ne può provocare facilmente la morte.

-IMIDACLOPRID: È un insetticida che fa capo alla classe dei cloronicotinici neonicotinoidi. Da recenti stime è considerato uno dei più diffusi insetticidi di nuova generazione, ciò è giustificato dall'ampissimo spettro di azione sugli insetti. La molecola è un inibitore irreversibile del recettore nicotinico dell'acetilcolina degli insetti, mentre è molto meno attivo su quello dei mammiferi. Da numerosi studi risulta una non rilevabile tossicità sull'uomo a concentrazioni operative normali.

Il periodo di applicazione delle misure antivettoriali dovrà coincidere con il periodo di attività dei vettori, ovvero:

-dalla metà di Maggio alla fine di Settembre per il nord Italia

-dalla metà di Maggio alla metà di Ottobre per il centro Italia

-dall' inizio di Maggio alla fine di Novembre per il sud Italia

I periodi dovranno essere considerati orientativi, dipendendo dalle variazioni climatiche annuali.

La periodicità dei trattamenti dipende dalle misure prescelte, elencate successivamente:

>Un complesso deltametrina/trifenilfosfato per applicazione tramite banda protettiva (collare) ad elevato effetto protettivo e letale della durata di 5-6 mesi;

>Una specialità a base di permetrina(65%) per applicazione topica ad elevato effetto protettivo e letale ;

>Un'associazione permetrina/piriproxifene per applicazione topica ad elevato effetto protettivo e letale della durata di quattro settimane;

>Un'associazione permetrina(50%)/imidacloprid(10%) per applicazione topica(Advantix®) ad elevato effetto protettivo e letale della durata di due settimane per *P. papatasi* e tre settimane per *P. perniciosus*, mentre ha un'efficacia di quattro settimane per le infestazioni da pulci (*Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*) e per le infestazioni da zecche (*Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus*). Inoltre fornisce protezione contro le zanzare rispettivamente per due settimane (*Aedes aegypti*) o per quattro settimane (*Culex pipiens*) e contro la mosca cavallina (*Stomoxys calcitrans*) per 4 settimane. La dose minima raccomandata è di 50 mg/kg di permetrina e 10 mg/kg di imidacloprid.

-Profilassi sanitaria indiretta rivolta al serbatoio

Il trattamento dei cani infetti/malati rende necessario sia individuare i soggetti infetti sia sottoporli a terapia. È fondamentale istituire una lotta efficace al randagismo. È opportuno evitare che i cani soggiornino all'aperto nelle ore in cui è più intensa l'attività del flebotomo (da un'ora prima del tramonto, alle prime ore del mattino, un'ora dopo l'alba), nei periodi in cui questo è presente maggiormente (maggio-settembre) ricoverando gli animali in luoghi chiusi protetti con zanzariere a maglie molto fitte (80-100 maglie/cm²). È possibile anche applicare ripetutamente sostanze repellenti direttamente sul pelo del cane naturali (citronella), e non -piretroidi (48).

La soluzione ideale è quella di rendere resistente alla pressione naturale la maggior parte dei cani, senza fare semplicemente affidamento sulla compliance del proprietario o sulle sue capacità nell'applicare le opzioni parassicide. Il metodo più adatto per il controllo di questa malattia è un vaccino ovviamente da utilizzare contemporaneamente al controllo dei vettori tramite parassitocidi e repellenti

-Dal 2013 in Italia è in commercio un vaccino: Canileish costituito da antigeni (almeno 100µg ESP), adiuvante (60µg di QA-21), eccipiente del liofilizzato TMS, solvente 1ml di NaCl allo 0,9%. Le ESP sono preteine escrete-secrete prodotte da numerosi protozoi parassiti *Leishmania*, *Toxoplasma*, *plasmodium*, ed altri... Studi sulla specifica proliferazione anti-*Leishmania* dei linfociti di topo condotta da Rosa et al hanno portato alla conclusione che le ESP di *L. infantum* sono i migliori fattori stimolanti la proliferazione dei linfociti Th1 rispetto alla proteina grezza del parassita. E' interessante notare che una percentuale significativa delle ESP era formata da

proteine della famiglia degli antigeni di superficie parassitari (PSA). I PSA sono già stati definiti come importanti antigeni di superficie in numerose pubblicazioni, è una famiglia di glicoproteine che inizialmente si riteneva fosse espressa solo dai promastigoti, ma è stato dimostrato che erano espresse anche negli amastigoti di *L. infantum*, ciò naturalmente è estremamente importante poiché il parassita arriva nell'organismo sotto forma di promastigote, ma nel cane passa la maggior parte del suo ciclo vitale sottoforma di amastigote.

Il QA-21 gli adiuvanti a base di saponina possiedono la rara capacità di stimolare già a basse dosi l'immunità cellulo-mediata, oltre a quella umorale. La loro capacità di stimolare la risposta Th1 e la produzione di linfociti T citotossici li rende ideali per l'impiego nei vaccini contro i patogeni intracellulari(16). Il QA-21 è un componente purificato della saponina Quil-A (recente saponina adiuvante frazione parzialmente purificata della corteccia dell'albero *Quillaja saponaria*), possiede un ottimo profilo di tollerabilità generale e si è dimostrato accettabile in dimostrazioni su vaccini per uso umano, è anche utilizzato da molti anni con un eccellente profilo di tollerabilità nel vaccino per la FELV nei gatti (leucogen). Il QA-21 è meglio tollerato rispetto al Quil-A , e finora ha indotto, in sperimentazioni con un altro vaccino protipocontro *Leishmania*, un livello più elevato di produzione di IFN γ .

Eccipiente del liofilizzato Canileish contiene un tampone (Tris) per mantenere il corretto Ph, un lioprotettore (saccarosio) per prevenire il danno proteico durante il processo di congelamento e un agente di carica per il pellet liofilizzato (mannitolo)

Un modello di infezione sperimentale ha dimostrato la capacità protettiva di canileish un anno dopo l'ultima vaccinazione. Dopo 2 anni di esposizione naturale, la vaccinazione ha ridotto di circa 4 volte la probabilità di infezione attiva.

Il vaccino è indicato nei cani a partire dai 6 mesi di età, il ciclo primario è costituito da 3 iniezioni somministrati a intervalli di 3 settimane, successivamente per mantenere questa immunità è necessaria una vaccinazione annuale. Tutti i cani devono essere sottoposti a test sierologici che confermano la negatività all'infezione.

CAPITOLO 2

Definizione di anemia e varie tipologie

2.1 Definizione di anemia

L'anemia consiste nella diminuzione della massa degli eritrociti e, nella pratica clinica, può essere definita come la riduzione dell'ematocrito (PCV "packed cell volume"), delle concentrazioni di emoglobina o del numero degli eritrociti (RBC "red blood cell") al di sotto dei limiti considerati normali nelle varie specie animali. L'anemia è un sintomo di una malattia, non costituisce una diagnosi primaria, quindi è necessario caratterizzarla attraverso esami di laboratorio, al fine di poter determinarne il tipo e ricercarne la causa(49)

2.2 Variabili che caratterizzano l'anemia

Una volta stabilita la presenza dell'anemia, sulla base di una prima valutazione ematologica, il passo successivo comporta una sua classificazione. Diversi modelli sono stati impiegati per classificare le anemie:

- Risposta rigenerativa: conta dei reticolociti;
- Indici eritrocitari: volume corpuscolare medio (MCV) e concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCHC) ;
- Morfologia degli eritrociti valutata attraverso l'esame citologico dello striscio di sangue periferico(50).

2.2.1 Risposta rigenerativa:

La risposta rigenerativa del midollo osseo a un'anemia è un aumento fino a otto - dieci volte nella produzione eritrocitaria. Le risposte rigenerative più intense sono osservate nell'anemia emolitica (aumento sei-otto volte) e le risposte rigenerative moderate sono osservate, di solito, nell'anemia emorragica (aumento di due-quattro volte). Possono, comunque, verificarsi delle eccezioni. Le anemie osservate nei tre, quattro giorni successivi ad una perdita ematica o a emolisi non mostreranno segni di rigenerazione nel sangue periferico, poiché la produzione di eritrociti richiede quattro giorni. Questa condizione è definita come pre-rigenerativa. L'assenza di reticolociti in un'anemia in corso indica un difetto di produzione e autorizza a compiere ulteriori indagini.(51)

I reticolociti identificano i globuli rossi immaturi provvisti di RNA residuo, e corrispondono ai policromatofili alla valutazione dello striscio di sangue periferico con colorazioni ematologiche

rapide (es. Diff-Quik). Possono essere misurati mediante metodi manuali (valutazione microscopica di striscio di sangue colorato con nuovo blu di metilene) o strumentali (sistemi ottici). Lo studio del reticologramma rappresenta un metodo di valutazione diretto dell'evento rigenerativo. In merito ai metodi manuali, l'uso di coloranti sopravitali come il nuovo blu di metilene, consente di identificare alla valutazione di uno striscio i reticolociti: il materiale reticolare, costituito da ribosomi, mitocondri e altri organelli presenti nelle cellule immature, assorbe il colorante conferendo alla cellula un aspetto reticolare. (si miscela un volume di sangue intero addizionato di K^3EDTA con un pari volume di soluzione di nuovo blu di metilene diluito al 0,5% in NaCl, il preparato allestito va lasciato in posa per 15-20 minuti a temperatura ambiente e si prepara uno striscio). (50)

Il grado della risposta all'anemia è rappresentato dalla conta reticolocitaria corretta. Il metodo più attendibile è calcolare la conta reticolocitaria assoluta. Questo calcolo esprime l'entità della risposta per unità di volume di sangue intero ed è perciò, più appropriato di un valore percentuale. La normale conta reticolocitaria assoluta per un cane è circa $60 \times 10^9 /L$. Aumenti fino a $360 \times 10^9 /L$ rappresentano quindi, un aumento di sei volte nella produzione eritroide nel midollo osseo.

2.2.2 Indici eritrocitari:

Gli eritrociti sono definiti da cinque parametri qualitativi indiretti :

- MCV (volume corpuscolare medio): è un indicatore indiretto delle dimensioni medie dei globuli rossi. Un aumento dell'MCV, indicato con il termine di macrocitosi, è tipico delle anemie rigenerative, nelle quali è associato a una diminuzione di MCH e MCHC. L'anemia non rigenerativa è invece solitamente normocitica, cioè con un valore di MCV nella norma. Le anemie da carenza di ferro sono caratterizzate da basso MCV (microcitosi). Alcuni fattori possono generare artefatti: eccesso di EDTA, ipernatriemia e invecchiamento del campione (es. campioni prelevati da 2 o più giorni) portano a rigonfiamento in vitro degli eritrociti e conseguentemente a un aumento di MCV.
- MCH (emoglobina corpuscolare media): è indicazione della massa dell'emoglobina. Bassi valori sono riconducibili ad alterazioni nella sintesi dell'Hb. Non tenendo in considerazione il volume eritrocitario risulta poco utile tranne che in animali con eritrociti macrociticici ipocromici. Le forme di anemia ipercromiche sono per lo più imputabili ad artefatti per la sovrastima della concentrazione di emoglobina causata da emolisi.
- MCHC (concentrazione emoglobinica media): è un indice della solubilità dell'emoglobina, cioè della quantità di emoglobina presente nelle singole cellule. È un parametro più affidabile di quanto non lo sia l'MCH. Se un animale sano ha un MCV vicino ai valori inferiori del range di riferimento, l'MCHC può risultare basso anche se la cellula contiene una quantità normale di emoglobina in rapporto alle sue dimensioni (è giusto che le cellule più piccole abbiano meno emoglobina di quelle più grosse). L'MCHC tiene conto di questo e, di conseguenza, sarà invece normale. Un MCHC normale permette di definire le cellule come normocromiche. La sua diminuzione è sinonimo di

ipocromasia ed è tipica delle anemie rigenerative e delle carenze di ferro. Il suo aumento è spesso dovuto a emolisi, ed eventuali artefatti (lipemia, ittero, leucocitosi, corpi di Heinz e iponatremia).

· RDW (ampiezza di distribuzione eritrocitaria): descrive il grado di variabilità nelle dimensioni dei globuli rossi (anisocitosi). Una diminuzione dell'RDW indica degli eritrociti con diametro molto simile (questo parametro non è patologico). È un indicatore più precoce dell' MCV perché quest' ultimo, essendo un valore medio, si altera solo quando un numero relativamente elevato di cellule ha una dimensione anomala, mentre RDW rappresenta l'intera popolazione di cellule.

(50)

2.2.3 Morfologia degli eritrociti:

La morfologia degli eritrociti è valutata mediante l'esame di uno striscio ematico colorato. Qualsiasi deviazione dalla classica forma a disco biconcavo è identificata e valutata semiquantitativamente e può portare a una diagnosi o a interpretazioni specifiche.(51)

2.3 classificazione dell'anemia

Anemie da disfunzione midollare comprendono la riduzione della produzione eritrocitaria, i difetti della sintesi nucleotidica e le sindromi mielodisplastiche;

Anemie da aumentata distruzione eritrocitaria: comprendono l'emolisi di eritrociti normali o l'emolisi dovuta a difetti sia genetici sia ereditari degli eritrociti;

anemie da aumentata perdita eritrocitaria comprendono le emorragie interne o esterne.

2.3.1 Anemie da disfunzione midollare

I requisiti fondamentali per la produzione di eritrociti sono le cellule staminali, le citochine e un appropriato microambiente midollare ,tra cui viene incluso un adeguato rapporto ematico,di ossigeno e di nutrienti. Quando una di queste componenti è insufficiente, l'eritropoiesi può risentirne.

- Ridotta produzione di eritrociti

Le anemie appartenenti a questa categoria saranno non rigenerative, normocitiche e normocromiche. Una concomitante leucopenia o trombocitopenia dovrebbero indurre il clinico a sospettare la possibilità di un'anemia aplastica o di una mielofibrosi. In queste condizioni le cellule staminali totipotenti possono essere danneggiate , sopresse (aplasia: mancata crescita) o dislocate (mielottisi: distruzione midollare).

Tra le possibili cause di aplasia midollare vi sono i danni da radiazioni, da piante tossiche (la felce nelle vacche) da virus(virus della leucemia felina, FeLV), da ormoni (estrogeni,soprattutto nel

cane), da farmaci (es. sulfamidici), da sostanze chimiche che si accumulano nel fegato (es. DDT, idrocarburi ciclici) e l'agente infettivo *Ehrlichia Canis*.

La mielottisi rappresenta una lesione che occupa spazio nel midollo osseo, la quale inibisce o sposta dalla loro sede le cellule emopoietiche sane. Ne sono un esempio le neoplasie midollari, le leucemie, le metastasi neoplastiche, la mielofibrosi e le malattie granulomatose infiammatorie del midollo osseo, come l'istoplasmosi, le infezioni fungine sistemiche e la tubercolosi miliare.

L'anemia da insufficienza renale cronica è, di solito, da leggera o moderata e non rigenerativa. È dovuta principalmente alla mancata produzione di eritropoietina da parte dei reni coinvolta nell'eritropoiesi. Oltre alla riduzione dell'emivita degli eritrociti per effetto delle tossine uremiche, perdita emorragica da ulcere intestinali, ridotta funzionalità piastrinica e aumentata tendenza al sanguinamento, inibizione dell'eritropoiesi da parte di elevate concentrazioni di ormone paratiroideo, inappetenza, danneggiamento degli eritrociti a causa della glomerulonefrite e fibrosi renale.

L'anemia da malattia infiammatoria, la forma più comune di anemia negli animali domestici, è associata sia all'infiammazione acuta sia a quella cronica. La patogenesi comprende un complesso di modificazioni innescato da citochine pro-infiammatorie (TNF e IL1) che inibiscono l'eritropoiesi esercitando una sottoregolazione sui recettori per l'eritropoietina espressi sulla superficie delle cellule staminali eritroidi differenziali. Al tempo stesso, altre citochine stimolano la produzione granulocitaria a produrre i leucociti necessari per combattere l'infezione. Il ferro di deposito (sotto l'influenza dell'IL1) viene convertito da ferritina alla forma meno disponibile, cioè l'emosiderina; il ferro è legato saldamente all'aptoglobina e alla lattoferrina nei leucociti, divenendo inutilizzabile sia per la produzione di eritrociti sia per l'utilizzazione da parte dei batteri. La concentrazione di ferro sierico circolante è, di conseguenza, ridotta, ma così anche la sua proteina di trasporto, la transferrina. Inoltre, gli eritrociti di pazienti malati, legando una maggiore quantità di immunoglobuline di superficie, di conseguenza, hanno un'emivita più ridotta, essendo fagocitati più rapidamente del normale.

Altre condizioni che causano un'anemia non rigenerativa includono la deficienza di proteine assunte con la dieta, la soppressione dell'eritropoiesi da parte del TNF in alcune parassitosi, epatopatie croniche.

- Difetti nella sintesi nucleotidica

Delle malattie appartenenti a questa categoria è deficitario il microambiente, poiché manca il corretto apporto di valori nutritivi essenziali per la sintesi nucleotidica. Lo sviluppo nucleare resta in ritardo rispetto allo sviluppo citoplasmatico e le cellule prodotte possono essere grandi ovvero megaloblasti che. Le concentrazioni di eritropoietina sono aumentate e la produzione cellulare procede in maniera anormale ne consegue che i difetti della sintesi di DNA o RNA causano un ritardo nella sintesi nucleare, che inducono un'asincronia dello sviluppo cellulare. Queste cellule sono riconosciute come anormali e distrutte dal midollo osseo. Ne deriva un'eritropoiesi inefficace. Il problema si estende a tutte le cellule che si accingono ad andare in mitosi. Esempi di questa forma di anemia si verificano in caso di deficienza di acido folico, di vitamina B12, di cobalto. Queste malattie sono rare negli animali, ma possono essere indotte dalla somministrazione di

antagonisti di folati (sulfamidici, fenobarbitale) o possono verificarsi in pazienti con tumori maligni, nei quali le riserve di questi elementi possono essere esaurite.

- Difetti nella sintesi dell' emoglobina

Lo sviluppo citoplasmatico subisce un ritardo rispetto allo sviluppo nucleare. Queste condizioni patologiche possono essere considerate come difetti della sintesi dell'eme o della porzione globinica che possono portare a un' eritropoiesi inefficace. Un classico esempio di difetto della sintesi del gruppo eme è l'anemia da deficienza di ferro. In questa malattia la concentrazione di eritropoietina è elevata e le cellule staminali sono adeguate, ma la mancanza di ferro disponibile comporta una maturazione del citoplasma eritrocitario ritardata e difettosa. Le cellule in via di sviluppo possono subire una mitosi addizionale allo stadio di rubrociti basofili in attesa del processo di emoglobinnizzazione, diventando di conseguenza più piccole (microcitiche) e ipocromiche. Le cellule che ne risultano sono più fragili del normale, hanno forma di una lacrima (dacriociti) e molte sono distrutte prematuramente. Altre condizioni che comportano un difetto nella sintesi del gruppo eme nei piccoli animali sono l'avvelenamento da piombo e la porfiria eritropoietica. Una ridotta assimilazione di ferro può essere osservata negli animali giovani nel periodo dello svezzamento, animali con ridotta funzionalità o neoplasie dell'apparato gastroenterico, patologie che comportano un'alterazione nell'assorbimento del ferro e di altri principi nutritivi. Esempio di un difetto nella sintesi della porzione globinica sono la talassemia e l'anemia falciforme nell'uomo.

- Sindromi mielodisplasiche

Le sindromi mielodisplasiche sono caratterizzate da una displasia (sviluppo anormale) di una o più linee cellulari emopoietiche in un midollo osseo ipercellulare, con una concomitante citopenia nel sangue periferico. Per definizione in, questa patologia, nel midollo osseo vi sono meno del 30% di blasti. Spesso la mielodisplasia è associata a un'anemia refrattaria scarsamente rigenerativa e le cellule prodotte possono essere malfunzionanti. Nel cane, questa malattia può essere primaria, come risultato di una mutazione genetica di una cellula staminale totipotente, o secondaria e associata alla somministrazione di farmaci.

2.3.2 Anemia da aumentata distruzione degli eritrociti

L'emolisi può essere considerata il risultato di un difetto intrinseco o estrinseco degli eritrociti, che provoca la distruzione delle cellule a una velocità più elevata del normale di conseguenza le cellule hanno un'emivita più breve e possono mostrare alcune alterazioni morfologiche. Alterazioni specifiche nella forma degli eritrociti possono fornire degli indizi sulla causa dell'emolisi. Ne sono esempi l'anemia emolitica immunomediata (sferociti), segni di danni intravascolari (schistociti, cheratociti), alterazioni biochimiche (poichilociti) oppure parassiti intracellulari (es. Haemobartonella, Babesia). Gli eritrociti possono essere distrutti mediante lisi diretta nel circolo ematico (emolisi intravascolare) oppure attraverso eritrofagocitosi da parte dei macrofagi nella milza, nel fegato, nel midollo osseo o nei linfonodi (emolisi extravascolare) o in entrambi i modi. L'anemia nelle malattie emolitiche è, di solito, molto rigenerativa, con un numero elevato di

policromatofili. La marcata risposta midollare può essere caratterizzata da un aumento della produzione eritrocitaria di otto dieci volte, come è altrettanto rilevato dalla conta reticolocitaria assoluta. A lungo termine, comunque, la continua emolisi e la stimolazione del midollo osseo, soprattutto in caso di malattie emolitiche ereditarie, possono alla fine portare a una mielofibrosi e, in alcuni casi, all'osteosclerosi.

- Emolisi dovuta a difetti genetici degli eritrociti

Sono malattie rare in cui gli eritrociti possono avere una forma o una membrana anormali (ellissociti, stomatociti) oppure un difetto enzimatico, che ne riducono l'emivita. Altre malattie emolitiche ereditarie possono essere associate a difetti dell'accumulo del rame, al malassorbimento della vitamina B12 e a epatopatie.

- Emolisi dovuta a difetti acquisiti degli eritrociti

I difetti acquisiti degli eritrociti sono la causa più comune di emolisi. Il meccanismo fondamentale che provoca la lisi cellulare è, di solito, una lesione diretta della membrana oppure la lisi osmotica. Di solito sono osservate modificazioni morfologiche nell'anemia emolitica. Le cause comprendono: alterazioni biochimiche (corpi di Heinz, ipofosfatemia); esposizione a emolisine chimiche (metalli pesanti come piombo, zinco, argento); emolisine batteriche animali o vegetali (veleno di alcuni tipi di ragni o serpenti); la fissazione degli anticorpi o del complemento sugli eritrociti (anemie emolitiche); danni meccanici degli eritrociti (malattie associate a lesioni vascolari, valvolari o alcuni tumori maligni); parassiti (Babesia Canis, Haemobartonella Felis, H. Canis)

- Emolisi di eritrociti normali

Qualsiasi malattia che abbia come conseguenza l'ipersplenismo può essere associata a un aumento dell'eritrofagocitosi da parte dei macrofagi splenici. Il microambiente all'interno di una milza aumentata di volume espone le cellule a valori di pH elevati e a basse concentrazioni di glucosio, con il risultato di un prematuro invecchiamento cellulare. I pazienti affetti da questa patologia possono sviluppare un'anemia emolitica con un aumento di metarubriciti (eritroblasti ortocromatici), corpi di Howel-Jolly e poichilocitosi, in associazione, a una trombocitopenia lieve.

2.3.3 Anemia da aumentata perdita di eritrociti:

L'emorragia è una perdita passiva di sangue intero, che può essere interna o esterna, o essere contemporaneamente di entrambi i tipi.

Entrambe le forme possono essere gravi e fatali a seconda della quantità di sangue persa. Una perdita di sangue pari al 30-40% del volume ematico totale conduce a uno shock ipovolemico, mentre quando la perdita ematica è superiore al 40% del volume ematico totale, è probabile che

sopraggiunga la morte del soggetto. Il volume ematico totale nei cani è di circa 84 mL/kg, e nei gatti di 64 mL/kg. Nelle emorragie interne, la maggior parte degli eritrociti è riassorbita per via linfatica entro pochi giorni e le emazie rientrano nuovamente in circolo leggermente danneggiate nella forma. Altre cellule sono fagocitate e il loro ferro contenuto è riciclato sotto forma di depositi di emosiderina nei macrofagi. L'emorragia esterna implica una perdita di ferro e di proteine plasmatiche da parte dell'organismo, comportando una deplezione delle riserve organiche di ferro e, a lungo termine, una diminuita capacità di rigenerazione.

I pazienti che hanno un'emorragia mostrano notevoli cambiamenti nell'emodinamica. In seguito ad un'emorragia iperacuta vi può essere ipotensione con un valore di PVC normale. L'anemia e l'ipoproteinemia possono non svilupparsi fino a 4-24 ore dopo l'episodio emorragico, in seguito all'emodiluizione dovuta alla redistribuzione dei fluidi corporei. Una significativa riduzione delle proteine plasmatiche, del PCV e della concentrazione emoglobinica avviene dopo 12-24 ore, quando il volume plasmatici si è espanso fino a raggiungere livelli approssimativamente normali.

L'anemia emorragica è generalmente rigenerativa, ma questa risposta può essere osservata solo dopo 3-4 giorni. In questo periodo l'anemia può essere considerata pre-rigenerativa. L'intensità della risposta dipende dalla disponibilità di ferro. Il ferro nella forma ferrica è meno prontamente disponibile e utilizzabile nell'anemia da emorragia che nell'anemia emolitica. Ciò spiega il minore incremento medio nella produzione eritrocitaria, pari a 2-4 volte il normale, osservato nelle anemie da emorragia, secondo la stima basata sulla conta reticolocitaria assoluta. I valori di picco nella conta reticolocitaria possono essere osservati una settimana dopo l'episodio emorragico. Le piastrine nei pazienti che hanno subito un'emorragia inizialmente diminuiscono di numero e poi possono aumentare. In un'anemia emorragica instauratasi da parecchi giorni è molto probabile che compaia una trombocitosi. La trombocitosi inizialmente è causata dalla mobilizzazione delle piastrine dalla milza in risposta all'increzione adrenalina, ma possono verificarsi anche una stimolazione midollare generale oppure una stimolazione delle linee cellulari eritroidi e megacariocitiche.

Alcune anemie molto rigenerative negli stadi iniziali possono essere macrocitiche e ipocromiche. In caso di una perdita ematica esterna e continua, l'anemia è generalmente normocitica e normocromica e la concentrazione delle proteine plasmatiche rimane ridotta. Se si sviluppa una deficienza di ferro, l'anemia può diventare microcitica e ipocromica.

Le cause di anemia emorragica comprendono: trauma, parassiti (*Ancylostoma*, *Uncinaria*); difetto dei fattori della coagulazione; difetti delle piastrine; rotture di masse neoplastiche, aneurismi.

2.4 Evoluzione delle cause di anemia

In tutte le specie animali la causa più comune di anemia è quella da malattia infiammatoria. Questa di solito, causa solo un'anemia leggera o moderata, è normocitica, normocromica e non è rigenerativa. Alcune indagini pubblicate hanno dimostrato che i cani hanno un'eguale probabilità di presentare anemia non rigenerativa e anemia da emorragia, mentre circa il 70% delle anemie riportate nel gatto sono non rigenerative.(51)

Parte Sperimentale

CAPITOLO 3

3.1 OBIETTIVO DELLA RICERCA

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare lo stato anemico associato ad infezione da *Leishmania infantum*. In particolare tale studio è stato condotto su due diversi gruppi di cani e in tempi diversi. Un primo gruppo (Gruppo A) è stato oggetto di uno studio trasversale condotto su 222 cani eseguito precedentemente all'anno 2010; il secondo gruppo (Gruppo B), formato da 111 cani, invece è stato valutato secondo uno studio longitudinale e retrospettivo a partire dal 2009 ad oggi, volto a valutare la progressione dell'infezione verso lo stadio di malattia.

3.2 MATERIALI E METODI

gruppo A

Sono stati esaminati duecentoventidue cani (126 maschi, 56,8% e 96 femmine 43,2%) di razze differenti, età compresa tra 1-12 anni e peso tra 15-45 kg. Tutti i cani arruolati nello studio erano stati inviati, durante i precedenti tre anni, presso la Facoltà di Veterinaria di Napoli per diagnosi di Leishmaniosi. Alla visita clinica, la presenza di uno o più dei seguenti segni fu considerata indicativa di infezione da *Leishmania infantum*: perdita di peso, anoressia, dermatite esfoliativa, cheratite, uveite e splenomegalia.

I cani sono stati classificati a seconda dei segni clinici in tre gruppi (Oliva et al., 1995)

- ***asintomatici*** nessun segno clinico;
- ***oligosintomatici*** da 1 a 3 segni clinici;
- ***sintomatici*** più di 3 segni clinici.

La diagnosi di Leishmaniosi è stata confermata dalla positività sierologica al test di immunofluorescenza indiretta per la ricerca di anticorpi specifici anti – *Leishmania infantum* (IFAT) (cut off : 1/160).

I cani con titolo IFAT \geq 1/160 sono stati inclusi nello studio se veniva dimostrata la presenza di amastigoti di *Leishmania infantum* su strisci di materiale ottenuto da aspirato linfonodale e/o midollare.

Su tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati eseguiti:

Un esame emocromocitometrico con esecuzione della formula leucocitaria (CBC); nei casi di anemia grave o molto grave è stato calcolato il valore RPI “reticulocytes production index” (valore di riferimento nell'anemia rigenerativa: \geq 2), allo scopo di classificare l'anemia in rigenerativa o non rigenerativa; se sospettato, un meccanismo emolitico immuno-mediato, è stato eseguito un test di Coombs' indiretto.

Il profilo ematobiochimico e delle urine completo.

Sono stati inoltre testati sierologicamente per escludere altre malattie infettive quali per esempio Ehrlichiosi, Babesiosi e Filariosi.

I criteri di esclusione includevano la gravidanza, lattazione, bisogno di terapie d'urgenza e trattamenti specifici anti-*Leishmania* durante tre mesi precedenti.

gruppo B

Sono stati esaminati 111 cani (56 maschi - 50,4% - e 55 femmine -49,5%-), di differenti razze di cui il 97,7% di razza beagle, età compresa tra i 6 mesi e i 3 anni e peso tra i 6-20kg. Questo studio retrospettivo, è stato condotto reclutando soggetti (Napoli e provincia) già inseriti in un altro gruppo di studio inerente la Leishmaniosi, da cui sono stati estrapolati gli esami clinici, ematologici e parassitologici permettendo l'ampliamento dei dati già ricavati nel gruppo A .

I soggetti esaminati sono stati classificati secondo lo status di infezione da *Leishmania infantum* come segue (43):

- **negativo**: nessuna positività alle indagini parassitologiche per *Leishmania infantum*;
- **infezione subpatente**: positività alla PCR midollare; titolo IFAT $\leq 1/160$; coltura linfonodale negativa, assenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche attribuibili a *Leishmania infantum*;
- **infezione attiva asintomatica**: positività alla PCR midollare; titolo IFAT $\geq 1/160$; positività alla coltura linfonodale; assenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche attribuibili a *Leishmania infantum*;
- **infezione attiva sintomatica**: positività alla PCR midollare; titolo IFAT $\geq 1/160$; positività alla coltura linfonodale; presenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche causate da *Leishmania infantum*;

I cani arruolati nello studio sono stati sottoposti a indagini:

parassitologiche (sierologia , PCR e coltura linfonodale);

ematobiochimiche (esame emocromocitometrico, azotemia, creatinina, proteine totali, rapporto A/G)

esame delle urine con determinazione della proteinuria.

In **entrambi** i gruppi:

per **l'esame emocromocitometrico**, sono stati prelevati dalla giugulare 3 ml di sangue, raccolti in provette contenenti EDTA e sottoposti ad analisi automatizzate attraverso l'impiego di un conta globuli elettronico automatico(SEAC- Genius/S/VET-Hemat 8) per CBC e conta piastrinica. Le analisi della morfologia cellulare e la conta differenziale leucocitaria sono state effettuate su strisci colorati con metodiche di routine. Per analizzare i risultati del CBC sono stati impiegati i valori di riferimento del Laboratorio di Clinica Patologica della nostra Facoltà:

I parametri di laboratorio usati per la determinazione dello stato anemico erano: PVC, RBC ed Hgb. La gravità dell'anemia è stata classificata secondo il valore PVC, come segue:

PVC di 37-55% intervallo considerato normale,

PVC 30-36% anemia lieve,

PVC 20-29% anemia moderata,

PVC 13-19% anemia grave,

PVC <13% anemia molto grave,

Per la classificazione morfologica dell'anemia sono stati usati gli indici RBC di **MCV** "volume corpuscolare medio" (intervallo di riferimento **60-76 fL**) e del **MCHC** "concentrazione emoglobinica corpuscolare media" (valore di riferimento **32-36 g/dL**).

Per valutare la trombocitopenia è stata effettuata la conta totale delle piastrine **PLT** (intervallo di riferimento: **200-400 cellule/uL**). La trombocitopenia è stata confermata dall'esame citologico degli strisci di sangue periferico per escludere una pseudotrombocitopenia, un artefatto di laboratorio e la presenza di aggregati.

La conta totale dei leucociti **WBC** (intervallo di riferimento **6-16 cellule/ μ L**) includeva la conta assoluta e relativa di neutrofili, linfociti ed eosinofili.

Il profilo biochimico e l'esame delle urine sono stati eseguiti su tutti i cani per escludere patologie renali ed altre condizioni responsabili di anemia.

Il **profilo biochimico** è stato effettuato su un campione di sangue (7ml) raccolto in provette senza anticoagulante e centrifugato a 2500s per 20min. Il siero ottenuto è stato sottoposto ad analisi automatiche (Analyzer Medical System-SABA 18) per rilevare la creatinina e l'azotemia sierica (intervallo di riferimento: **creatinina < 1,4 mg/dl; azotemia 20-40 mg/dl**).

Tutti i campioni di urina sono stati ottenuti tramite cistocentesi, raccolti in provette ed analizzati immediatamente dopo la raccolta. Un primo **esame delle urine** consisteva nell'uso delle striscette colorimetriche "Combur Test" per la valutazione dei parametri biochimici (pH delle urine, sangue, glucosio, chetoni, bilirubina, urobilinogeno e una valutazione semiquantitativa della concentrazione proteica). La determinazione del rapporto creatinina/proteine (UPC) è stata ottenuta misurando i valori delle proteine totali urinarie (usando il "Microproteine-PR TM Kit – Sigma Diagnostics" e i valori di creatininuria utilizzando il "Kodak Ektachem Clinical Chemistry Slides"(Crea) intervallo di riferimento **UPC \leq 0,5** (unico valore nelle analisi delle urine inserito nella statistica del risultato finale). Una valutazione microscopica del sedimento è stata effettuata per mostrare la presenza di eritrociti, leucociti, microorganismi, cellule epiteliali, cristalli.

Nei cani del gruppo B data la tipologia di studio retrospettivo non è stato possibile escludere mediante indagini sierologiche la contemporanea confezione con altre patologie trasmesse da vettori. Le fasi acute delle più frequenti tra esse (Ehrlichiosi, Babesiosi) sono state escluse solo sulla base della valutazione clinica, in particolare dello stato febbrile.

La valutazione statistica è stata eseguita attraverso il test del Chi-quadro .

3.3 RISULTATI

GRUPPO A

Tutti i cani inclusi nello studio mostravano segni clinici di infezione da *Leishmania infantum*.

In 177 cani i titoli IFAT anti-*Leishmania* presentavano un intervallo tra 1/160 e 1/1024, mentre, in 45 cani con un titolo IFAT inferiore, l'infezione è stata confermata dalla presenza di amastigoti su strisci ottenuti da ago aspirato linfonodale o midollare. 71/ 222 cani (31.9%) mostravano, inoltre, la presenza di anticorpi anti-*Ehrlichia canis* con titoli IFAT superiori o uguali a 1:320. Nessun cane è stato trovato positivo sierologicamente a *Babesia* o *Dirofilaria*.

L'esame emocromocitometrico rilevava una condizione di anemia in 83/222 cani (37.3%), classificata in leggera in 51(61.4%), moderata in 27(32.6%), e grave in 5 cani (6.0%). Non sono stati individuati casi di anemia molto grave. (Tabella n. 1)

L'anemia è stata classificata morfologicamente in normocitica/normocromica in 64/83 cani(77.1%), normocitica/ipocromica in 9 (10.9%), microcitica/normocromica in 5 (6.0%) e microcitica/ipocromica in 5 (6.0%).

RPI, esaminato in 32/84 cani anemici, rivelava valori maggiori di 2 (mediana 2.8) in 4 di questi (12.5%).

Tra i 5 cani con anemia grave, questo fu rapportato ad una condizione normocitica/normocromica in 4 soggetti e normocitica/ipocromica in 1 cane.

La conta totale dei leucociti ha rilevato leucocitosi in 32/222cani (14.4%) e una leucopenia in 13(5.9%).

La trombocitopenia è stata osservata in 108/222 cani (48.6%).

Tutti i cani anemici e trombocitopenici esaminati col test di Coombs' sono risultati negativi.

Il profilo ematobiochimico ha evidenziato una ipercreatininemia (>1.4 mg/dl) in 9/222 cani (4.0%) e iperazotemia (> 50 mg/dL) in 23/222 cani (10.4%).

All'ispezione clinica, i cani sono stati classificati in: asintomatici 53 (23.9%), oligosintomatici 75 (33.7%), sintomatici 94 (42.3%). La correlazione tra le alterazioni di laboratorio riscontrate e lo stadio clinico della malattia, sono riportati per esteso nella tabella 2, e possono essere riassunti come segue:

-La prevalenza di uno stato anemico era significativamente più alta nei soggetti sintomatici (45/83, 54.3%) che negli asintomatici (10/83, 12.0%) (p=0.000) e negli oligosintomatici (28/83, 33.7%) (p=0.000).

- I cani sintomatici mostravano una prevalenza significativa di una lieve (p=0.000) e moderata (p=0.014) condizione anemica paragonate al gruppo degli asintomatici. Una anemia grave non è risultata significativamente diversa tra i 3 gruppi clinici, ma è stata rilevata in 5 cani e 4/5 di questi erano sintomatici.

- Anche la trombocitopenia non è risultata significativamente diversa nei 3 gruppi considerati.
 - Analogamente, la leucocitosi e la leucopenia
 - Gli esami degli strisci di sangue periferico hanno rilevato una lieve neutrofilia e/o eosinofilia nei 32 cani che mostravano leucocitosi. In 6/8 (75.0%) cani con insufficienza renale cronica, sono stati osservati acantociti e schistociti; è stata rilevata poichilocitosi in 11/83 (13.2%) cani anemici. In 4/5 cani con policromasia macrocitica/ipocromica, erano presenti anisocitosi ed eritrociti nucleati.
- I 9 cani (4.0%) che mostravano ipercreatininemia e i 23 cani(10.3%) che mostravano iperazotemia, erano equamente distribuiti tra i gruppi degli asintomatici, oligosintomatici e sintomatici. 8/9 cani (88.9%) con un'alta creatinina sierica erano anche anemici, al contrario, i cani con iperazotemia erano ugualmente divisi nei gruppi degli "anemici" (11, 47.9%) e "non anemici"(12, 52.2%).
- L'esame delle urine mostrava proteinuria in 101/222 cani (45.4%) collocati tra 300 e 3 g/L (intervallo di riferimento minore di 100 mL); in questi cani il rapporto UPC va da 0.1 e 3.2. 57/101 (56.4%) dei cani con proteinuria erano anche anemici.

Tabella n.1 Caratteristiche di Anemia in 83 cani (Gruppo A) con Leishmaniosi

<i>Valutazione della Gravità</i>	<i>Numero di Cani (%)</i>	<i>Can Asintomatici(%)</i>	<i>Can Oligosintomatici(%)</i>	<i>Can Sintomatici(%)</i>
<i>Anemia lieve</i>	51 (61.4)	8 (15.6)	17 (33.3)	26(50.9)
<i>Anemia moderata</i>	27 (32.6)	2 (7.4)	10 (37.0)	15(55.5)
<i>Anemia grave</i>	5 (6.0)	0	1 (20.0)	4(80.0)
<i>Anemia molto grave</i>	0	0	0	0
<i>Tot .cani anemici</i>	83/222 (37.3%)	10/83 (12.0%)	28/83 (33.7%)	45/83 (54.3%)
<i>Classificazione morfologica</i>	<i>Numero di Cani (%)</i>	<i>Can Asintomatici(%)</i>	<i>Can Oligosintomatici(%)</i>	<i>Can Sintomatici(%)</i>
<i>Normocitica/Normocromica</i>	64(77.1)	10(15.6)	18 (28.1)	36 (56.2)
<i>Normocitica/Ipocromica</i>	9 (10.9)	0	5 (55.5)	4 (44.5)
<i>Microcitica/Normocromica</i>	5 (6.0)	0	3 (60.0)	2 (40.0)
<i>Macrocitica/Ipocromica</i>	5 (6.0)	0	2(40.0)	3(50.0)

Tabella n.2 Alterazioni clinico-patologiche associate alle condizioni cliniche di Leishmaniosi (Gruppo A)

<i>Parametri</i>	<i>Tot. cani (%)</i>	<i>Cani Asintomatici (no.53)</i>	<i>Cani Oligosintomatici (no.75)</i>	<i>Cani Sintomatici (no.94)</i>
<i>Trombocitopenia</i>	108/222(48.6)	32/108 (29.6%)	40/108 (37.0%)	36/108(33.3%)
<i>Leucocitosi</i>	32/222 (14.4)	8/32 (25.0%)	15 (46.8%)	9/32 (28.2%)
<i>Leucopenia</i>	13/222 (5.8)	3/13 (23.0%)	4/13 (30.7%)	6/13 (46.1%)
<i>Ipercreatininemia</i>	9/222 (4)	2/9 (22.4%)	3/9 (33.4%)	4/9 (44.5%)
<i>Iperazotemia</i>	23/222 (10.3)	4/23 (17.4%)	6/23 (26.0%)	13/23(56.5%)
<i>IFAT titolo ≥ 1:160</i>	177/222(79.7)	34/177(19.2%)	57/177 (32.2%)	86/177(48.5%)
<i>IFAT titolo < 1:160</i>	45/222 (20.2)	19/45 (42.2%)	17/45 (37.7%)	9/45 (20.0%)

GRUPPO B

Tutti i cani inclusi nello studio mostravano una condizione di infezione da *Leishmania infantum*: 50/111 (45,0%) avevano infezione subpatente, 13/111 (11,7%) infezione attiva asintomatica e 48/111 (43,2%) infezione attiva sintomatica. Come definito in precedenti lavori (Foglia Manzillo et al., 2013) e in base alle classificazioni sopra riportate sono stati considerati esclusivamente i dati dei cani con infezione attiva sintomatica, poiché l'infezione sub patente è per definizione asintomatica.

Nei soggetti con *infezione attiva sintomatica* (43,2%), l'esame emocromocitometrico rilevava una condizione di anemia in 40/48 cani (87,5%), classificata in lieve in 15 (37,5%), moderata in 15 (37,5%), e grave in 9 cani (22,5%); in questo gruppo è stato individuato 1 solo caso di anemia molto grave (2,5%).

L'anemia è stata classificata morfologicamente in normocitica/normocromica in 22/40 cani (55%) normocitica/ipocromica in 3 (7,5%), microcitica/normocromica in 11 (27,5%) e microcitica/ipocromica in 4 (10%).

La conta totale dei leucociti ha rilevato leucocitosi in 1/48 cani (2,08%) e una leucopenia in 6 (12,5%). La trombocitopenia è stata osservata in 32/48 cani (66,6%). Il profilo ematobiochimico ha

evidenziato una ipercreatininemia (>1.4 mg/dl) in 11/48 cani(22,9%) e iperazotemia (> 50 mg/dL) in 16/48 cani (33,3%). L'esame delle urine mostrava proteinuria in 20/33 (60,6%); su 15 cani non è stata possibile eseguire l'esame.

Il confronto statistico tra i due gruppi ha evidenziato una differenza altamente significativa ($p = 0.000$) tra il numero di cani anemici, più elevato nel gruppo B, sia considerando l'intero gruppo A, sia quando sono stati confrontati i soli cani sintomatici dello stesso gruppo. Anche considerando la gravità dello stato anemico emergono differenze significative tra i due gruppi, in particolare tra gli stati anemici lievi, più frequenti nel gruppo A ($p= 0.014$) e gravi, più frequenti nel gruppo B ($p = 0.014$). Il tipo di anemia è risultato più frequentemente normocitico/normocromico nel gruppo A ($p.0.023$), a differenza di quella di tipo microcitico/normocromico risultata più frequente nel gruppo B ($p= 0.003$). Tra gli altri parametri di laboratorio considerati, la trombocitopenia è risultata più frequente nei cani del gruppo B ($p = 0.035$) così come la proteinuria ($p= 0.011$) e l'aumento di creatinina ed azotemia ($p = 0.000$). All'interno dello stesso gruppo B la gravità dell'anemia non è risultata correlabile al titolo anticorpale. I dati relativi alla conta leucocitaria, al contrario, non hanno mostrato differenze significative tra i due gruppi.

3.4 DISCUSSIONE

Nei cani con Leishmaniosi le maggiori modificazioni ematologiche descritte sono l'anemia e la trombocitopenia(14)(18)(43). Le più frequenti cause descritte nella patogenesi dell'anemia in corso di CanL sono diseritropoiesi, sequestro splenico degli eritrociti dovuto ad anomalie cellulari, citochine pro-infiammatorie inibenti la sintesi di eritropoietina, carenza di ferro, meccanismi immunomediati e alterazioni nella permeabilità della membrana degli eritrociti (34);

I due gruppi considerati sono stati valutati secondo una prospettiva completamente diversa: quella trasversale che riflette la condizione del Medico Veterinario nell'esecuzione della prima visita e quella longitudinale che consente di seguire la progressione dell'infezione da stadi al limite della rilevabilità sino alla piena espressione di malattia. E' ovvio quindi che il confronto tra i risultati dei due tipi di osservazione deve tenerne conto. Un dato che emerge alla prima osservazione è sicuramente il limite della classificazione dei cani leishmaniotici adottata in passato, sulla sola base dei segni clinici esterni osservati, che da molti Autori è stata definita come non adeguata (32)(. Anche nel nostro studio, infatti, il 22% dei cani del gruppo A definiti asintomatici presentava anemia, e quindi uno stato palese di malattia. Ad ogni modo, pur con i limiti della classificazione adottata, l'anemia è un segno clinico frequente in corso di leishmaniosi canina, indipendentemente dalla condizione clinica di prima presentazione, e deve essere considerata un segno precoce di malattia (43). Dai dati presi in considerazione in cani portati alla prima visita, emerge anche che il

tipo di anemia più frequente è senza dubbio quello normocitico/normocromico di grado lieve, scarsamente rigenerativo, considerato a patogenesi infiammatoria. Quando è invece possibile seguire gli animali nel tempo, senza che gli stessi siano sottoposti a trattamento terapeutico specifico, è possibile osservare la progressione dell'anemia verso stati gravi, con comparsa frequente di quadri microcitici/normocromici, espressione di esaurimento funzionale midollare. Purtroppo data la natura retrospettiva dello studio B non è stato possibile ottenere il conforto dell'esame citologico midollare, né della conta reticolocitaria, inizialmente non previsti. E' ovvio che la progressione della malattia osservabile nei cani del gruppo B influisce sulla maggior frequenza di alterazioni rilevabili, quali il danno renale che si conferma molto frequente in corso di leishmaniosi canina, anche in prima osservazione. E' utile ribadire come il rilievo della proteinuria debba essere considerato un marker indispensabile, sia in soggetti portati in prima visita che in quelli seguiti nel tempo. Anche la trombocitopenia accompagna frequentemente lo stato anemico del cane con leishmaniosi. La patogenesi della trombocitopenia in corso di CanL non è completamente chiara; Le cause più frequenti di trombocitopenia e /o trombocitopenia sono: vasculiti, alterata trombocitopoiesi, aumento della distruzione delle piastrine. Studi più recenti hanno dimostrato la presenza di anticorpi anti-piastrine nel plasma di cani naturalmente infetti da *Leishmania* che presentavano una bassa conta piastrinica. Nel nostro studio tale condizione è più frequente nei cani osservati in maniera longitudinale ed è da considerarsi un segno precoce di progressione dell'infezione (Foglia Manzillo et al., 2013). Nel gruppo A, nel quale è stato possibile eseguire test sierologici per le più comuni malattie infettive trasmesse da vettori, è stata registrata una discreta presenza di cani sieropositivi per *Ehrlichia canis*. In questi casi anche se non è possibile escludere che l'infezione trasmessa da zecche possa contribuire alla genesi della piastrinopenia e dell'anemia, può essere affermato che le due condizioni fossero più probabilmente imputabili all'infezione di *L. infantum* perché nessuno di questi cani trombocitopenici, anche se con presenza di un test IFAT anti-*Ehrlichia canis* positivo, mostravano altri segni clinici di infezione acuta o cronica da *E. canis* (febbre, emorragie oculari, coagulopatie). Alcuni studi hanno confermato, infatti, che la positività sierologica ad *Ehrlichia canis*, persiste in cani dopo il trattamento o, probabilmente, guarigione spontanea, e non è necessariamente correlata a sintomi clinici di Ehrlichiosi, specialmente in aree altamente endemiche, come il sud Italia. In molti di questi cani, i titoli anticorpali decrescono progressivamente dopo il trattamento e generalmente si abbassano fino a diventare non rilevabili entro 6 - 9 mesi; tuttavia, l'infezione può persistere in alcuni cani asintomatici, che mantengono alti titoli anticorpali di *E. canis* per vari anni (Neer, 2002), anche dopo terapia specifica. Anche la negatività del test di Coombs, eseguito solo nei

soggetti del gruppo A dimostra ulteriormente che il meccanismo patologico alla base dell'anemia in corso di Leishmaniosi è raramente di tipo immunomediato.

La patogenesi della trombocitopenia in corso di CanL non è completamente chiara; Le cause più frequenti di trombocitopenia e /o trombocitopenia sono: vasculiti, alterata trombocitopoiesi, aumento della distruzione delle piastrine (38). Studi recenti (Terrazzano et al., 2006) hanno dimostrato la presenza di anticorpi anti-piastrine nel plasma di cani naturalmente infetti da *Leishmania* che presentavano una bassa conta piastrinica. I cani sintomatici mostravano la maggior parte delle alterazioni dei parametri di laboratorio considerati nello studio: leucocitosi, leucopenia, ipercreatininemia, iperazotemia, al contrario, i cani classificati come asintomatici mostravano modificazioni minime dei dati di laboratorio.

La proteinuria, secondo recenti studi, (15) è la più comune alterazione di laboratorio nei cani con leishmaniosi, tuttavia, la sua correlazione con la comparsa dell'anemia non è ancora stata studiata.

CONCLUSIONI

Il nostro studio conferma che l'anemia è un riscontro molto frequente in corso di Leishmaniosi. Nel nostro caso la maggioranza di cani anemici mostrava una lieve anemia classificata come normocitica/normocromica iporigenerativa, quando i cani sono osservati in maniera trasversale, mentre la condizione anemica progredisce invariabilmente verso stati più gravi quando gli animali sono monitorati nel tempo. Lo studio longitudinale conferma che l'infezione leishmanica, una volta attecchita, evolve sempre verso stadi gravi di malattia e non vi è possibilità di regressione spontanea se non dopo adeguato trattamento terapeutico. Questo dato, oltre a suggerire di considerare l'anemia di tipo centrale come uno dei segni più frequenti in corso di Leishmaniosi canina, impone al Medico Veterinario di instaurare repentinamente protocolli terapeutici adeguati per evitare la progressione del danno. Questo studio conferma anche che la classificazione degli animali malati in base ai segni clinici osservabili alla sola visita clinica è senza dubbio fuorviante e può condurre ad errate valutazioni sulla gravità della malattia.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Urquhart G.M., Armour J, Duncan J.L., Dunn A.M, Jennings F.W – Parassitologia veterinaria. 1985: 254-261.
- 2) Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, et al, transplacental transmission of a North American isolate of *L. infantum* in an experimentally infected beagle. *J. Parasitol*, 2005;
- 3) Silvia FL, Oliveira RG, Silvia TM, et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol*, 2009
- 4) de Freitas E, da Costa-Val AP, Michalick MS, Transmission of *L. infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet. Parasitol*, 2006)
- 5) Marcato P.S., Macri B., Burdisso R. 2002. Granulomi da protozoi in Paolo Stefano Marcato. *Patologia sistematica veterinaria*.
- 6) Gramiccia M. Gradoni L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35:1169-1180.
- 7) Edagricole, Bologna Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, 2002
- 8) WHO (1993) the Leishmaniasis. CTD/MIP/WP.93.8. WHO/HQ. Geneva.
- 9) Pampiglione S. and Bettini S. (1981). Bibliografia delle Leishmaniosi. *Ann. Ist. Sup. Sanità* 17:1-150
- 10) Pozio E., Gradoni L., Gramiccia M. (1985). La leishmaniose canine en Italie de 1910 a 1983 m. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60:543-553
- 11) Bettini S. and Gradoni L. (1986). Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implication for human leishmaniasis. *Insect Sci. Appl.* 7: 241-245
- 12) Natale A. (2004). La leishmaniosi in Italia. *Obiett. Doc. Vet.* 12: 23-28.
- 13) Capelli G., Baldelli R., Ferroglio E., Genchi C., Gradoni L., Gramiccia M., Maroli M., Mortarino M., Pietrobelli M., Rossi L., Ruggiero M. (2004). Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parassitologia* 46: 193-197
- 14) Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, et al.: A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 141(21):539-543, 1997
- 15) Zatelli A., Borgarelli M., Santilli R., Bonfanti U., Nigrisoli E., Zanatta R., Tarducci A., Guarraci A., Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *American Journal of Veterinary Research* May 2003, Vol. 64, No. 5, Pages 558-561
- 16) Urquhart G.M., Armour J, Duncan J.L., Dunn A.M, Jennings F.W (1998) *Parassitologia veterinaria*. Edizione italiana a cura di Claudio Genchi. UTET.
- 17) Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit Med J* 1903; 2:1261-1262.
- 18) Ortiz G., Navarro M., Segovia M. (1995). Location in the source chromosome of the 180-kb minichromosome of *Leishmania major* and characterization of the novel junction. *Mol Biochem Parasitol.* 71:153-61
- 19) Chance ML.; Walton BC. (1982). Biochemical characterization of *Leishmania*. *UNDP/World Bank/WHO: Geneva*
- 20) Krobitsch S., Clos J. (1999). A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones* 4:191-198.

- 21) Killick-Kendrick R, Rioux JA. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia* 2002, Jun
- 22) Maroli M., Gramiccia M., Gradoni L., Troiani M., Ascione R. (1994). Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* with an enzymatic variant of *Leishmania infantum* in the Campania region of Italy. *Acta Trop.* 57:333–335.
- 23) Pampiglione, Canestri Trotti, Guida allo studio della parassitologia, 3^oedizione, Gennaio 1999, Esculapio editore.
- 24) Ferroglio E., Centaro E., Mignone W., Trisciungoglio A., (2007) Evaluation of an ELISA rapid device for sierologiccal diagnosis of leishmania infantum infection in dog as compared with immunofluorescence assay and western blot. *Veterinary parasitology*, 144, 162-166
- 25) Killick-Kendrick R, Rioux JA, Bailly M, Guy MW, Wilkes TJ, Guy FM, Davidson I, Knechtli R, Ward RD, Guilvard E, et al., 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 Cévennes. – *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 1984, 59(6):555-72.
- 26) Bates PA, Transmission of *Leishmania metacyclic promastigotes* by phlebotomine sandflies. *int.j. Parasitol*, 2007
- 27) Ribeiro J.M. – Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? – *Infect. Agents Dis.* 1995 Sep; 4(3):143:52
- 28) Murphy E, Shibuya K, Hosten N, et al. reversibility of Thelper I and II populations is lost after long-term stimulation. *J. Exp. Med.*, 1996
- 29) Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, et al. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitology*, 2008
- 30) Solano-Galeno L, Morell P, Arboix M, et al Prevalence of *L. infantum* infection in dogs, living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology, *Clin Microbiol*, 2001
- 31) Alvar J, Cañavate C, Molina R, et al. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004;57:1–88.
- 32) Buonaccorsi A. “Le malattie del cane e del gatto – diagnostic e terapia medica” Ed. “Essegi” Bologna 1995:30
- 33) Foglia Manzillo V., Paparcone R., Cappiello S., De Santo R., Biancardi P., Oliva G., (2009). Resolution of tongue lesions caused by *leishmania infantum* in a dog treated with the association miltefosine-allopurinol. *Parasit Vectors.* 26; 2 Suppl1:S6.
- 34) Kountas VJ, Koutinas AF, (1993). Old world canine leishmaniasis. *Vomp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 15:949-960.
- 35) Koutinas AF, Scott DW, Kantos V, et al. (1992). Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-azar): A clinical e histopatological study of 22 spontaneus casus in Greece. *Vet Dermatol.* 3:121-130.
- 36) Vamvakidis CD. “Masticatory and skeletal muscle miositi in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*)”. *Vet Rec.* 2000 Jun 10. 146v(24): 698-703.
- 37) Ferrer L. (1992), *Leishmaniosis Kirk’s current veterinary therapy XI*, ed. WB. Saunders. Philadelphia: 266-270.
- 38) Buracco P., Abate R., Guglielmino R., Morello E. (1997). Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *leishmania donovani* infection in dog. *J. of Anim. Pract.* 38: 29-30.
- 39) Margarito JM, Ginel PJ, Molleda JM, Moreno P, Novales M, Lopez R (1994). Hemangiosarcoma associated with leishmaniasis in three dogs. *Vet. Rec.* 134:66-67.
- 40) Zini E, Bonfanti U, Zatelli A.: Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. *AmJ Vet Res* 65:964-971, 2004.

- 41) Oliva G, Foglia Manzillo V, Pagano A. "Canine leishmaniasis: evolution of the chemotherapeutic protocols". *Parassitologia*. 2004 Jun; 46 (1-2): 231-4.
- 42) Foglia Manzillo V, Di Muccio, Cappiello S, Scalone A, Paparcone R, Fiorentino, Gizzarelli, Gramiccia, Gradoni, Oliva G. prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naive dogs infected by *L. infantum*, 2013
- 43) Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. "Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological avances". *Vet J*. 2006 Dec 4.

- 44) leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione parte 1: approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico Castagnaro et al, 2008
- 45) Bryceson ADM 1987. "The Leishmaniasis" in *Biology and Medicine*. Vol. II W. Peters, Killick-Kendrick eds. Academic press, Londres: 847-907
- 46) leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione parte 2: approccio terapeutico, Oliva et al, 2008
- 47) Maroli M, Majori G. "Permethrin-impregnated curtains against phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae): laboratory and field studies". *Parassitologia*. 1991 Dec; 33 Suppl: 399-404.
- 48) Molina R, Miro G, Galvez R, Nieto J, Descalzo MA. "Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*". *Vet Rec*. 2006 Aug 12; 159 (7): 206-9.

- 49) Richard W. Nelson, C. Guillermo Couto "Medicina interna del cane e del gatto 2002 cap.85 anemia.

- 50) H.J.Day, A.Mackin, J.D. Littlewood "Ematologia e medicina trasfusionale del cane e del gatto" 2004 cap.3 anemia.
- 51) E. Villiers, L. Blackwood "gli esami di laboratorio indicazioni, esecuzione interpretazione cane e gatto 2005 edizione italiana a cura di Saverio Paltrinieri