

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II**  
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**

**VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTI-LEISHMANIA DEL  
DOMPERIDONE IN CANI NAIVE ESPOSTI AD  
INFEZIONE NATURALE**

**TUTOR**  
*Prof. Gaetano Oliva*

**CANDIDATA**  
*Dott.ssa Manuela Gizzarelli*

**Anno Accademico 2013/2014**

# INDICE

- **PREMESSA**
- **CAPITOLO 1 – LA LEISHMANIOSI CANINA: CARATTERI GENERALI**
  - 1.1 INTRODUZIONE
  - 1.2 EPIDEMIOLOGIA
  - 1.3 L'AGENTE EZIOLOGICO
  - 1.4 IL VETTORE
  - 1.5 CICLO BIOLOGICO
  - 1.6 PATOGENESI E RISPOSTA IMMUNITARIA
  - 1.7 SINTOMATOLOGIA
  - 1.8 DIAGNOSI
  - 1.9 TERAPIA
- **CAPITOLO 2 – LA PREVENZIONE**
  - 2.1 INTRODUZIONE
  - 2.2 PREVENZIONE CONTRO I FLEBOTOMI VETTORI
  - 2.3 VACCINI
  - 2.4 IL DOMPERIDONE
- **CAPITOLO 3 – PARTE SPERIMENTALE**
  - 3.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO
  - 3.2 MATERIALI E METODI
    - 3.2.1 DISEGNO DELLO STUDIO
    - 3.2.2 SOGGETTI ESAMINATI
    - 3.2.3 TEMPI
    - 3.2.4 SOMMINISTRAZIONE DEL FARMACO
    - 3.2.5 VISITA CLINICA
    - 3.2.6 PRELIEVI E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI
    - 3.2.7 STATISTICA
  - 3.3 RISULTATI
  - 3.4 DISCUSSIONE
- **BIBLIOGRAFIA**

La presente tesi, descrive le metodiche e i risultati di uno studio clinico volto a valutare l'efficacia del Domperidone nei confronti della Leishmaniosi canina in cani naïve esposti all'infezione naturale. Il trial clinico, regolarmente autorizzato dal Ministero della Salute, è stato supportato da una casa farmaceutica veterinaria alla quale appartengono i diritti di pubblicazione dei risultati nella loro interezza. Lo studio è frutto di un lavoro svolto nell'arco di due anni che comprende due stagioni consecutive di trasmissioni; all'atto della consegna della tesi lo studio era ancora non concluso di conseguenza i risultati e le conclusioni devono essere ritenuti non definitivi e non influenzabili quanto attualmente riportato in letteratura riguardo l'utilizzazione del farmaco.

# **CAPITOLO 1 – LA LEISHMANIOSI CANINA: CARATTERI GENERALI**

## **1.1 INTRODUZIONE**

La leishmaniosi canina è una malattia infettiva a carattere zoonosico, ad interessamento sistemico ed evoluzione generalmente cronica, causata da protozoi del genere *Leishmania*. E' trasmessa da varie specie di ditteri ematofagi del genere *Phlebotomus*, e oltre al cane, che ne rappresenta il principale serbatoio, la malattia è stata descritta anche in alcuni animali domestici e selvatici, tra cui bovino, pecora, capra, orso, cammello, volpe (1) e gatto (2).

Nell'uomo la malattia si esprime con una sintomatologia variabile che ne consente la distinzione in tre forme cliniche: (a) viscerale (LV), (b) cutanea (LC) e (c) mucocutanea (LMC) (3). Nel cane (serbatoio della forma viscerale zoonotica - ZVL) la leishmaniosi è paragonabile, per alcune sue espressioni cliniche, alla forma viscerale umana.

## **1.2 EPIDEMIOLOGIA**

La leishmaniosi è una zoonosi, a diffusione praticamente cosmopolita, endemica in circa 98 diversi paesi (4) in tutto il mondo. In Italia la malattia, inizialmente considerata esclusiva dei territori della costa tirrenica (5,6,7), si è sviluppata anche in zone del Nord Italia fino a pochi anni fa ritenute indenni (8). Come in numerosi altri Paesi, in Italia, la leishmaniosi canina è una malattia endemica, sebbene sia possibile nell'ambito del territorio distinguere aree non endemiche, aree ad endemia stabile ed aree ad endemia instabile. Nei focolai d'infezione instabili, si verificano pochi casi di leishmaniosi canina, e non sono riscontrati ad ogni anno (9).

Nei focolai d'infezione stabile, invece, si documenta una prevalenza dell'infezione estremamente alta e la trasmissione da cane a cane avviene con regolarità nei periodi estivi. In tali siti, la prevalenza della malattia risulta elevata: ad esempio a Sant'Anastasia (NA) è del 40.4% (10), a Ustica del 37%, nell'isola d'Elba del 19%.

Sempre nelle aree endemiche, si può riscontrare una particolare distribuzione della leishmaniosi canina, definita "a macchia di leopardo", caratterizzata dall'alternarsi di microfocolai a maggiore e minore prevalenza d'infezione. Queste variabilità si manifestano in base alla concentrazione dei flebotomi vettori presenti (11).

### **1.3 EZIOLOGIA**

L'agente eziologico della leishmaniosi è un protozoo appartenente all'ordine *Kinetoplastida*, famiglia *Trypanosomatidae*, genere *Leishmania*, subgenere *Leishmania* nel quale si riconoscono numerosissimi raggruppamenti di specie. 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, che rappresentano un insieme di ceppi aventi identica mobilità elettroforetica per gli enzimi esaminati (in genere un minimo di 12).

Esistono due principali sistemi di codifica degli zimodemi:

- a) il codice MON, attribuito dal Laboratoire d'Ecologie Medicale di Montpellier-Francia e utilizzato in tutti i paesi dell'area mediterranea;
- b) 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*:

- 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*:

- Complesso *L. braziliensis*, specie: *L. braziliensis* e *L. peruviana*;
- Complesso *L. guyanensis*, specie: *L. guyanensis* e *L. panamensis*.

L'unica specie di *Leishmania* presente in Italia è *Leishmania infantum* (conosciuta anche come *L. chagasi* in Sud America) il cui serbatoio naturale più importante è il cane.

### 1.3.1 Struttura parassitaria

**Struttura genomica:** i protozoi sono dotati di un DNA genomico (DNA<sub>g</sub>) localizzato all'interno del nucleo cellulare, e deputato alla moltiplicazione del parassita, ed un DNA extragenomico, chiamato DNA del kinetoplasto (DNA<sub>k</sub>) situato all'interno dell'unico mitocondrio presente che si divide indipendentemente. Inoltre nel genoma si rilevano anche elementi genetici circolari costituiti da copie 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. Il materiale genetico dei protozoi dell'ordine Kinetoplastida è organizzato in cromosomi il cui numero esatto non è ancora noto.

In generale si sa che *Leishmania* è un parassita diploide, asessuato, e possiede un genoma costituito da 34 – 36 cromosomi.

**Struttura proteica:** Il ciclo biologico del parassita prevede un drastico cambiamento morfologico con conseguente induzione di nuove proteine strutturali e sostituzione di altre. 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 che agiscono come “motori” del parassita e sono anch'esse responsabili di indurre una forte risposta umorale; la proteina omologa dei recettori delle 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.

## 1.4 IL VETTORE

I flebotomi, sono insetti ematofagi appartenenti alla famiglia *Psychodidae*, Ordine *Diptera*. La famiglia *Psychodidae* si suddivide in due sottofamiglie, *Psychodinae* e *Phlebotominae*, e quest'ultima comprende tutte le specie descritte di flebotomi (oltre 600). Almeno una trentina di specie sono possibili vettori, tra quelle presenti in Italia si

annoverano: *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus perfiliewi*, *Phlebotomus neglectus* (12,13).

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

L'habitat del flebotomo è quello caratterizzato dalla vegetazione a macchia mediterranea a 100-300 m sul livello del mare, ma può adattarsi anche ad altitudini che toccano i 1500 m. I flebotomi hanno attività crepuscolare e notturna e necessitano di temperature superiori ai 18°, di conseguenza la trasmissione dell'infezione nei climi tropicali avviene tutto l'anno, mentre in quelli temperati prevalentemente nel periodo compreso tra fine maggio e fine ottobre.

Hanno capacità di volo limitata, non si spostano più di qualche centinaio di metri, e sono disturbati dalle correnti d'aria: nelle notti ventose infatti, la loro attività è molto ridotta.

Per il loro mantenimento i flebotomi si nutrono di secrezioni zuccherine, mentre la femmina effettua il pasto di sangue, poiché ha bisogno delle proteine presenti nel sangue di un animale vertebrato per la maturazione delle uova. Le femmine, una volta alimentatesi, tornano ai loro rifugi naturali (dai quali non si allontanano per più di poche centinaia di metri) per deporre le uova 4-5 giorni dopo.

L'intervallo che separa il pasto di sangue dalla deposizione delle uova è noto come ciclo gonotrofico: i vettori adulti vivono in media quattro settimane per cui compiono il ciclo gonotrofico tre o quattro volte.



## 1.5 CICLO BIOLOGICO

*Leishmania infantum* è un microrganismo dixeno e dimorfico che necessita di un ospite intermedio, il vettore ematofago, e di uno definitivo, l'ospite vertebrato, per completare il proprio ciclo biologico (14).

Il ciclo ha inizio quando l'insetto vettore, durante il pasto di sangue su un ospite vertebrato infetto, assume il parassita sotto forma di amastigote. Gli amastigoti appaiono dentro il macrofago come organismi rotondeggianti od ovoidali dotati di un grosso nucleo sferico centrale o eccentrico e del kinetoplasto, a bastoncino, situato adiacente ad esso. In prossimità del kinetoplasto è presente il rizoplasto ovvero l'abbozzo di flagello che non si estende oltre il margine cellulare.

Gli amastigoti ingeriti dal vettore si trasformano nella forma flagellata, il promastigote, che segue diverse tappe di sviluppo all'interno dello stesso.

Sotto forma di promastigote si trova ancorato ai microvilli del tubo digerente dei flebotomi; il corpo misura circa 10 micron e possiede un kinetoplasto molto vicino al nucleo cellulare (*promastigote nectomona*). Progredendo verso le porzioni anteriori dello stomaco del flebotomo, il corpo diviene più corto e il flagello, si arricchisce di lipofosfoglicani, si accorcia per facilitare l'adesione alle lectine che rivestono il tubo digerente, e il kinetoplasto si localizza in posizione anteriore (*promastigote aptomona*).

Dopo circa dieci giorni dal suo ingresso nell'insetto vettore, il promastigote perde la sua aderenza in seguito ad una nuova configurazione dei lipofosfoglicani, il flagello diviene molto lungo rispetto al corpo stretto e corto, si forma una borsa flagellare ripiena di vescicole e materiale di secrezione; in questo stadio il parassita riacquista il suo potere infettante, localizzandosi già libero nell'ipofaringe, pronto per essere inoculato (*promastigote metaciclico infettante*). I promastigoti vengono così trasmessi ad un nuovo ospite quando il flebotomo compie un secondo pasto di sangue.

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

Nell'ospite vertebrato i promastigoti si legano ad alcune molecole di superficie dei macrofagi e vengono fagocitati; il fagosoma si fonde con i lisosomi formando il vacuolo parasitoforo nel quale i promastigoti metaciclici si ritrasformano in amastigoti intracellulari che si moltiplicano per fissione binaria. La sopravvivenza del parassita all'interno dell'ospite definitivo è dovuta ad alcune importanti molecole: il lipofosfoglicano (LPG) che migrando sulla superficie dei macrofagi infetti inibisce il burst ossidativo e l'attività degli enzimi lisosomiali; la gp63, una zinco-metalloproteasi in grado di inattivare gli enzimi proteolitici e la degradazione fagolisosomiale; antigeni tra cui una fosfatasi acida, in grado di modificare la risposta immunitaria dell'ospite.

## **1.6 PATOGENESI E RISPOSTA IMMUNITARIA**

L'aspetto immunopatogenetico delle malattie trasmesse da vettori, rappresenta un capitolo estremamente interessante e complesso, ad oggi non ancora del tutto chiarito, della medicina in generale e di quella veterinaria in particolare. Ciò è dovuto alla condizione unica che caratterizza tali patologie, ovvero la relazione che si sviluppa tra l'agente infettivo, il vettore e l'ospite definitivo, spesso ottenuta attraverso millenni di selezione naturale (15). I numerosi e variabili aspetti di questa stretta relazione, così come le diverse risposte del sistema immunitario dell'ospite definitivo, fanno sì che lo studio di tali patologie sia particolarmente complesso, sebbene per alcune di esse siano stati fatti molti progressi in merito, come nel caso della leishmaniosi canina.

Nella via di trasmissione classica della leishmaniosi canina, il flebotomo non rappresenta un semplice vettore passivo dell'infezione, ma ha un ruolo importante nel promuovere la penetrazione e la successiva propagazione dei promastigoti, grazie alle sostanze

contenute nella saliva, ovvero vasodilatatori, inibitori della coagulazione e fattori immunomodulatori che ne favoriscono l'attecchimento (16). Una volta inoculati nel derma, i promastigoti sono fagocitati dalla linea monocita/macrofagica trasformandosi in amastigoti; la loro successiva sopravvivenza e capacità di disseminarsi nell'organismo dipenderà sia da fattori intrinseci al parassita stesso, che dalla risposta immunitaria elaborata dall'ospite. Sono descritte varie tipologie di risposta immunitaria in corso di leishmaniosi canina, come lo sviluppo di infezione subclinica, autolimitante, oppure di malattia conclamata e, in quest'ultimo caso, sono inoltre rilevabili diverse forme, che vanno da minore a maggiore gravità con una prognosi estremamente variabile (17).

L'esito dell'infezione è strettamente connesso al tipo di risposta immunitaria che viene innescata dopo la presentazione dell'antigene parassitario ai linfociti T-helper da parte di macrofagi tissutali, cellule di Langherans e cellule dendritiche che, dopo aver fagocitato le leishmanie ne processano gli antigeni che poi espongono in superficie.

In ospiti normorecettivi il protozoo stimola l'attivazione delle difese immunitarie sia umorali che cellulo-mediate, ma è quest'ultimo tipo di risposta ed il profilo di interleuchine (IL) prodotte che determinano la resistenza/sensibilità all'infezione da *Leishmania*. E' dimostrato da numerosi studi che lo sviluppo dell'immunità protettiva dipende dalla risposta dei linfociti T CD4+ e soprattutto dipende dalla sottopopolazione di linfociti T helper attivata, se Th1 oTh2:

- la risposta Th1, è caratterizzata dalla produzione di IL-2, IL-12 e soprattutto di IFN- $\gamma$  e fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), responsabili dello sviluppo di una risposta immunitaria protettiva grazie alla stimolazione dei macrofagi alla produzione di sostanze in grado di uccidere il parassita, in particolar modo l'ossido di azoto (NO) (18). Tuttavia, studi hanno dimostrato come gli amastigoti, tramite alcuni lipofosfoglicani, possano rallentare l'attività ossidativa dei macrofagi e inibirne la risposta alle citochine.

- La risposta Th2, invece, si accompagna alla liberazione di interleuchine 4,5,6 e 10, che sopprimono l'attività parassitocida dei macrofagi e promuovono la proliferazione di linfociti B e quindi lo sviluppo di una risposta immune di tipo umorale (19).

Nonostante i numerosi studi condotti a riguardo, non è ancora chiarito il meccanismo tramite il quale in corso d'infezione, la risposta immunitaria cellulo-mediata sviluppata sia di tipo Th1 o Th2 all'infezione; l'ipotesi più suggestiva sottolinea l'importanza della modalità di presentazione dell'antigene *Leishmania*; diversi antigeni potrebbero stimolare diversi sottogruppi di cellule T con l'induzione ed espressione dell'immunità protettiva o di quella che promuove la malattia (14). Sicuramente un ruolo fondamentale a questo proposito è svolto dall'immunità innata, aspecifica, in quanto prima difesa incontrata dal parassita all'interno dell'ospite definitivo. Quando l'organismo è invaso da agenti esterni, grazie alla presenza di recettori Toll-like (TLRs) avviene il riconoscimento degli agenti patogeni che da una parte, fa sì che vengano trascritte e sintetizzate citochine infiammatorie (TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12) e chemochine, e dall'altra parte avvia lo sviluppo dell'immunità specifica acquisita, attraverso i linfociti B e T. Studi recenti hanno mostrato come i TLRs (soprattutto 2,3,4,7,8 e 9) abbiano un ruolo rilevante nel riconoscimento degli antigeni protozoari, come appunto *Leishmania*, sebbene ci siano ancora informazioni limitate in merito, soprattutto nel cane, mentre notevoli progressi si siano fatti nel modello murino.

Importante considerare che la risposta di tipo Th1, non implica necessariamente uno stato di protezione immutabile ma svariate condizioni, in primis la coinfezione da parte di altri agenti infettivi, possono determinare il passaggio dalla risposta Th1 a quella Th2 e la comparsa dei segni clinici.

Per quanto riguarda invece la risposta umorale in corso di leishmaniosi, essa, pur essendo imponente, non solo non è efficace nei confronti del parassita, ma si rende responsabile delle manifestazioni cliniche tipiche della patologia:

- l'opsonizzazione delle *Leishmanie* da parte degli anticorpi facilita la fagocitosi macrofagica, incrementando le cellule parassitate;
- la produzione massiva di anticorpi determina la formazione di grandi quantità di immunocomplessi responsabili di lesioni organiche e tissutali;
- la continua sollecitazione delle cellule immunocompetenti determina l'insorgere di uno stato immunopatologico caratterizzato da immunodepressione.

## 1.7 SINTOMATOLOGIA

Le manifestazioni cliniche della leishmaniosi canina si possono riscontrare in soggetti di età compresa tra 1 e 11 anni, sebbene siano più sensibili i cani di età inferiore ai 3 mesi o tra gli 8 e i 10 anni. Sono più suscettibili all'infezione i soggetti che vivono all'aperto, soprattutto se in aree endemiche. Non c'è stagionalità nella comparsa della malattia, considerando il periodo di incubazione della stessa molto variabile ( da 1 mese a 4 anni).

Nella maggior parte dei casi la patologia assume un andamento subacuto o cronico. Raramente è possibile osservare nei cuccioli una fase acuta con comparsa di febbre alta, e decorso particolarmente aggressivo (20).

I segni clinici sono molto variabili e spesso iniziano con una lenta e progressiva debolezza e intolleranza all'esercizio. È presente interessamento del sistema reticolo-endoteliale con coinvolgimento di linfonodi, fegato, milza e midollo osseo. La linfoadenomegalia, il segno di più frequente riscontro, può essere sistemica oppure interessare uno o più linfonodi (i prescapolari sono maggiormente colpiti) che alla palpazione appaiono aumentati di volume, non dolenti e di consistenza duro elastica. L'epato- e la splenomegalia sono un reperto meno costante.

Le alterazioni dermatologiche, anche esse frequentissime, variano in carattere e in estensione, ma raramente sono pruriginose. La maggior parte dei cani sviluppa una

alopecia progressiva e simmetrica con intensa e secca desquamazione che inizia, di solito, dalla testa e si estende al resto del corpo. Ulcere localizzate sul naso e sulla pinna, noduli cutanei e eruzioni di pustole possono essere presenti (21,22,23).

Frequente è il riscontro di lesioni oculari: uveite linfoplasmacellulare, congiuntiviti e cheratocongiuntiviti, blefariti più o meno diffuse, alopecia perioculare, glaucoma secondario ad uveite, eventuali distacchi retinici, cherato-congiuntivite secca (24,25).

Onicogrifosi, un reperto piuttosto specifico, si nota in una piccola percentuale di pazienti.

La perdita di peso e l'atrofia muscolare sono i segni più comuni di un coinvolgimento sistemico. Nei casi di malattia conclamata, l'attività fisica diminuita è correlata ad una riduzione delle resistenze, a sonnolenza e a disturbi dell'apparato locomotore che si manifestano con atrofia muscolare, soprattutto dei muscoli facciali e temporali che conferisce il tipico aspetto di "cane vecchio", e con zoppie spesso intermittenti e migratorie causate da polimiositi ed artrosinoviti. Talvolta le manifestazioni cliniche possono coinvolgere esclusivamente l'apparato muscolo-scheletrico (zoppia) (26).

Altro aspetto importante è la presenza nefropatia in corso di leishmaniosi canina: la compromissione renale può, in alcuni casi, rappresentare l'unica alterazione responsabile della sintomatologia (27) oltre ad essere la principale causa di morte nei cani affetti da leishmaniosi. La glomerulonefrite e la nefrite tubulointerstiziale sono le lesioni più frequenti, mentre l'amiloidosi è di più raro riscontro (28), in particolare il danno glomerulare è dovuto alla deposizione di immunocomplessi e si manifesta quasi sempre come glomerulonefrite membranoproliferativa o mesangioproliferativa (29).

La glomerulonefrite membranoproliferativa è più frequentemente associata ad insufficienza renale cronica, mentre nei cani privi di manifestazioni clinico-patologiche imputabili al danno renale di solito si rileva un danno di tipo mesangioproliferativo.

Va posta particolare attenzione nei confronti di quelle che sono lesioni atipiche in corso di

leishmaniosi: epatite cronica (30); disordini autoimmuni e lesioni cardiovascolari come pericardite, vasculite sistemica, tromboembolismo e sindrome da iperviscosità del siero; gonfiore articolare con poliartriti erosive o non erosive; lesioni ossee di tipo osteolitico e osteoproliferativo; colite cronica recidivante (31); manifestazioni neurologiche causate da meningite; miositi e polimiositi, con atrofia dei muscoli masseteri (32).

Studi recenti hanno anche permesso di correlare la leishmaniosi con l'insorgenza di atipiche alterazioni del cavo orale, che si manifestano come multiple lesioni nodulari e rossastre localizzate sulle facce dorsale e laterali della lingua e che all'esame citologico risultano caratterizzate dall'abbondante presenza di granulociti neutrofili, macrofagi (con all'interno *Leishmanie*), cellule epiteliali e linfociti. Si tratta probabilmente della conseguenza di una diffusione sistemica del parassita, non necessariamente associata ad una grave immunodepressione del soggetto, e le lesioni risultano responsive al trattamento con miltefosina e allopurinolo (33).

Tabella 1. Segni clinici in corso di leishmaniosi canina (34)

<b>Reperti clinici generali e specifici di particolari distretti dell'organismo in corso di leishmaniosi canina</b>	
<b>Generali</b>	Stato di nutrizione scadente fino alla cachessia
	Ipotrofia muscolare
	Letargia
	Pallore delle mucose
	Epistassi
	Aumento di volume da lieve a moderato dei linfonodi esplorabili
	Epato-splenomegalia
	Zoppie e tumefazioni articolari
	Febbre

**Cutanei e muco-cutanei**

Dermatite desquamativa (localizzata/generalizzata)

Dermatite ulcerativa con aspetto e distribuzione variabili

Giunzioni muco-cutanee

Cute che ricopre le estremità

Sedi sottoposte a trauma

Dermatite papulare

Dermatite nodulare

Lesioni nasali simil-lupus/pemfigo

Onicopatie

Ipercheratosi naso-digitale

**Oculari**

Lesioni palpebrali: vedi reperti cutanei e muco-cutanei

Lesioni congiuntivali diffuse e/o nodulari

Lesioni corneali per lo più associate a quelle congiuntivali (cheratocongiuntivite). Presenti anche forme di cheratite nodulare e di cheratocongiuntivite secca.

Lesioni della sclera: episclerite e sclerite diffusa e/o nodulare

Lesioni dell'uvea anteriore diffuse e /o granulomatose e lesioni dell'uvea posteriore (corioretiniti, emorragie e distacchi retinici). Possibili complicanze delle forme uveali, il glaucoma e la panoftalmite.

Lesioni orbitali granulomatose, miositi dei muscoli estrinseci

**Altri**

Gastrointestinali, neurologici, ecc.



## 1.8 DIAGNOSI

La diagnosi di leishmaniosi deve essere basata su un approccio integrato che tenga in considerazione: segnalamento, anamnesi, reperti fisici, alterazioni clinico patologiche, e risultati dei test di diagnosi eziologica diretti ed indiretti.

Segnalamento ed anamnesi: sebbene la leishmaniosi possa verificarsi in tutte le razze canine alcune, come ad esempio Pastore Tedesco e Boxer, sembrano essere predisposte (35). Potrebbe inoltre esistere una predisposizione di sesso per i maschi, che presentano un maggiore rischio di sviluppare la malattia (36,37), come descritto nella specie umana (38) e nel criceto.

In corso di leishmaniosi canina il quadro sintomatologico è estremamente polimorfo, di conseguenza la diagnosi risulta difficoltosa se non vi è il conforto di ulteriori approfondimenti diagnostici. Le indagini collaterali (Tabella n. 1.8.1) hanno quindi un ruolo di primaria importanza, e si possono distinguere in:

- **esami aspecifici**, rilevano alterazioni d'organo o di apparato che possono essere - direttamente o indirettamente - correlate con la leishmaniosi. Sono utili anche durante il follow up, permettendo di valutare le condizioni generali del paziente e la risposta alla terapia;
- **esami specifici**, consentono di ottenere la diagnosi di leishmaniosi in maniera diretta.

TABELLA 2 - Le principali indagini collaterali utilizzabili per la diagnosi di leishmaniosi canina

<b>ESAMI ASPECIFICI</b>	<b>ESAMI SPECIFICI</b>
<b><u>Esami ematobiochimici</u></b>	<b><u>Esami sierologici e molecolari</u></b>
Esame emocromocitometrico, uremia, creatininemia, ALT, AST, ALP, VES, quadro proteico elettroforetico	IFAT ELISA Dot ELISA Fissazione del complemento PCR
<b><u>Esami urinari</u></b>	<b><u>Metodi cito-istologici</u></b>
Esame delle urine con sedimento Rapporto Pu/Cu	
<b><u>Altre indagini</u></b>	<b><u>Esami parassitologici</u></b>
Test di immunologia clinica (ANA-test; latex test; test di Coombs)	- Esame colturale - Xenodiagnosi

### 1.8.1 Esami di laboratorio aspecifici

**Esame emocromocitometrico.** L'anemia è uno dei reperti clinici più frequenti nei cani affetti da leishmaniosi. Il più delle volte l'anemia è di tipo normocitico-normocromico e scarsamente rigenerativa (ipoplasia midollare). La patogenesi dell'anemia è piuttosto complessa e, molto verosimilmente, multifattoriale: i fenomeni immunomediati e/o autoimmuni sembrano giocare un ruolo di particolare rilievo, così come l'aumentata attività emocateretica da parte del sistema reticolo endoteliale splenico nei confronti dei globuli rossi opsonizzati dai complessi immunitari. Si può rilevare anche piastrinopenia per la probabile presenza di anticorpi antiplastrine (39). A differenza di quanto avviene nell'uomo, nel cane leishmaniotico non è presente leucopenia, bensì leucocitosi neutrofilica (40) per le infezioni secondarie cutanee, renali e di altri organi.

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

**Enzimi epatospecifici.** Il coinvolgimento epatico negli animali affetti da leishmaniosi non riveste la stessa importanza di quello renale, sebbene, in alcuni casi, il fegato rappresenti comunque un organo bersaglio. Le lesioni parenchimali, in genere non gravi, si manifestano con l'aumento delle concentrazioni sieriche degli enzimi transaminasi glutammico piruvica (ALT) e/o fosfatasi alcalina (ALP). Dopo adeguata terapia i loro valori tendono a normalizzarsi.

**Velocità di eritro-sedimentazione (VES).** L'aumento della VES nella leishmaniosi è un dato pressoché costante. Dipende soprattutto dall'anemia, dall'aumento delle  $\gamma$  globuline e del fibrinogeno, dalla presenza di immunocomplessi e dalla riduzione della quota

albuminica, tutti fattori che contribuiscono all'aggregazione e alla formazione di rouleaux a carico degli eritrociti.

**Protidemia totale e frazionata.** Le proteine totali aumentano in maniera evidente raggiungendo valori generalmente compresi tra 8 e 14 g/dl; tale aumento è da attribuire principalmente alle  $\beta$  e  $\gamma$  globuline, le quali il più delle volte appaiono fuse tra loro dando luogo ad un caratteristico ponte  $\beta$ - $\gamma$  nel tracciato elettroforetico. L'iperglobulinemia che si sviluppa nel corso della malattia è il frutto dell'attivazione policlonale dei linfociti B, che producono quantità abnormi di immunoglobuline per lo più aspecifiche. Le alterazioni del profilo elettroforetico si riflettono non solo a carico delle  $\beta$  e  $\gamma$  globuline, spesso è possibile rilevare anche un picco nella regione delle  $\alpha$ -2 globuline. L'aumento di tale frazione proteica può riconoscere una duplice motivazione: nella fase iniziale della malattia o nelle recidive dopo terapia, le  $\alpha$ -2 globuline possono esprimere l'aumento delle proteine della fase acuta, mentre nelle fasi di cronicizzazione ciò può essere espressione di un grave danno renale.

Un'altra frequente modificazione riguarda la frazione delle albumine. Si può rilevare una drastica caduta del picco dell'albumina sia come conseguenza della compromissione renale (perdita di albumina nel filtrato glomerulare), che di una scarsa sintesi epatica (coinvolgimento pressoché costante del fegato soprattutto nella fase cronica della malattia). In questi casi si osserva, pertanto, una inversione del rapporto albumine/globuline ed ipoproteinemia.

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

I test semiquantitativi impiegati nelle ricerche di screening per rilevare la presenza di proteine nelle urine sono molto sensibili, ma sono influenzati dalla concentrazione e dal volume delle urine stesse per cui risulta più utile la valutazione del rapporto Pu/Cu. È opinione generale che valori di PU/CU inferiori a 0,5 indichino una proteinuria non

significativa, i valori compresi tra 0,5 e 0,7 siano dubbi e necessitino di ulteriori approfondimenti e i valori superiori a 0,7 siano indicativi di proteinuria.

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

L'ulteriore tipizzazione delle proteine perse può essere effettuata mediante metodiche di SDS-PAGE e SDS-AGE che ne consentono la differenziazione in base al peso molecolare: l'escrezione di proteine ad alto peso molecolare (60-70000 d) è correlata ad un danno prevalentemente glomerulare, mentre il rilievo di proteine a basso peso molecolare è espressione di compromissione tubulare.

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

Un lavoro recente (41), ha valutato, in un ampio numero di cani osservato in maniera longitudinale durante due successive stagioni di trasmissione dell'infezione, quale sia, nel modello di infezione naturale, l'andamento dei segni clinici e delle alterazioni clinico-patologiche sopra riportate; tale studio, ha mostrato come le alterazioni clinico-patologiche, tendano a seguire un modello comune.

### **1.8.2 Esami di laboratorio specifici**

**Esami cito-istologici.** Hanno lo scopo di mettere in evidenza il parassita (amastigote) in organi e tessuti animali o in coltura. Sono metodiche molto specifiche, perchè si basano sull'osservazione diretta del parassita, ma sono poco sensibili (alta probabilità di diagnosticare falsi negativi). L'impiego degli anticorpi monoclonali e delle tecniche di immunistochemica, permette l'identificazione selettiva dei parassiti anche in campioni con

pochi parassiti, aumentando quindi la sensibilità di questi metodi.

L'identificazione diretta degli amastigoti liberi o all'interno dei macrofagi può essere ottenuta tramite esami citologici o istologici.

L'indagine citologica può essere effettuata a carico di:

1. lesioni cutanee papulari, nodulari e ulcerative: prelievo mediante ago-infissione (o ago-aspirazione) e/o apposizione; le lesioni ulcerative di natura ischemica possono però, risultare negative;
2. midollo osseo e linfonodi, in presenza di segni clinici o alterazioni clinico-patologiche riferibili ad un loro interessamento (anemia, linfadenomegalia, ecc.);
3. 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. Il materiale raccolto per la citologia può anche essere conservato ed inviato al laboratorio, in caso di risultato citologico negativo, per eseguire la ricerca del genoma di *Leishmania* mediante PCR (34). La maggior parte degli Autori ritiene che vi sia una correlazione diretta tra la gravità del quadro clinico ed il numero di parassiti che si rinviene nello striscio.

Esame istologico: il parassita può essere evidenziato in sezioni allestite da prelievi bioptici effettuati in varie sedi. In associazione al parassita, possono essere anche evidenziate le alterazioni compatibili con leishmaniosi canina, rappresentate da infiammazioni linfoplasmacellulari o granulomatoso-piogranulomatoso e/o vasculiti a carico di diversi organi, dermatopatie ischemiche, dermatiti linfoplasmacellulari dell'unione dermo-epiteliale, iperplasia linfoide a carico di milza e linfonodi. Il ricorso all'esame istologico è sempre consigliabile quando, nonostante un esame citologico negativo, permane il forte sospetto di leishmaniosi canina, soprattutto in presenza di dermatiti e nelle forme cutanee

caratterizzate da lesioni focali.

**Esami parassitologici.** Sono compresi:

Esame colturale: è sicuramente uno tra i test più specifici sebbene abbia lo svantaggio di richiedere tempi lunghi ed essere effettuato solo da alcuni laboratori specializzati.

Viene eseguito seminando il campione (midollo, linfonodo..) su un substrato colturale idoneo, generalmente terreno di Tobie modificato da Evans. La crescita dei promastigoti avviene in 3-5 giorni o a volte in due-tre settimane.

Xenodiagnosi: consiste nel far nutrire sul cane sospetto di essere affetto da leishmaniosi, un certo numero di flebotomi allevati in laboratorio che poi sono esaminati alcuni giorni dopo per evidenziarne l'eventuale presenza di promastigoti nell'intestino. Molto sensibile, ma scarsamente applicabile nella pratica (34).

**Diagnostica molecolare.** Le sonde molecolari e la "polymerase chain reaction" (PCR) permettono il ritrovamento di un numero estremamente esiguo di microrganismi o di frammenti del loro materiale genetico e l'identificazione di tratti genomici specifici di un determinato microrganismo. Le sonde molecolari vengono utilizzate per l'ibridazione del genoma di uno specifico microrganismo in campioni biologici fissati su vetrino. La PCR permette, invece, l'amplificazione del DNA-target che identifica il microrganismo in esame. E' un metodo molto sensibile, soprattutto se va ad amplificare sequenze genomiche "multicopia", presenti cioè in numero elevato in ogni singolo parassita, quali il DNA dei minicircoli del kinetoplasto (42). E' quindi in grado di identificare piccolissime quantità di DNA dei protozoi presenti nel materiale biologico esaminato. 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: midollo/linfonodo, cute, congiuntiva, buffy coat, sangue periferico.

Oltre alla PCR “convenzionale”, è possibile utilizzare la nested-PCR, una metodica più specifica, e la real-time PCR, che differenzia delle prime due, consente di quantificare il numero di copie del DNA del parassita, presenti nel campione biologico.

**Esami sierologici.** Le tecniche diagnostiche disponibili sono diverse. Alcune, come il Western Blotting, pur mostrando ottime prestazioni diagnostiche, non vengono utilizzate su larga scala per ragione 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), descritti di seguito:

- 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 (30-70 %) (43,44,45) e può quindi fornire risultati falsi negativi. In questi casi, se permane un forte sospetto diagnostico, l'indagine sierologica va approfondita con uno degli altri due test. 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.

- IFAT. Immunofluorescenza indiretta. È il test più largamente utilizzato, si basa sull'evidenziazione di anticorpi specifici nel siero del soggetto in esame (46). Questo test, pur presentando dei limiti, in primis la scarsa affidabilità per i titoli bassi (false positività e false negatività), continua a costituire ancora oggi l'esame più impiegato per la diagnosi della malattia. 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 sensibilità e specificità dell'IFAT sono prossime al 100 % (43,45,47) e per tale motivo il test viene considerato dall'Organizzazione Internazionale



delle Epizootie (OIE) il metodo sierologico di riferimento (48).

Sono i test maggiormente utilizzati per la diagnosi ed il controllo della leishmaniosi canina.

- ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. Si tratta di un test immunoenzimatico che utilizza antigeni solubili adsorbiti su piastre. La formazione del complesso antigene-anticorpo viene evidenziata mediante l'aggiunta di una antiglobulina di cane coniugata con un enzima che, in caso di positività, rivela una reazione colorimetrica che viene letta da uno spettrofotometro. Sovrapponibile alla tecnica ELISA è quella della DOT ELISA, che utilizza promastigoti interi fissati su un supporto in nitrocellulosa e collocati sul fondo di micropiastre; la reazione si svolge come una normale ELISA ma per la lettura non è necessario lo spettrofotometro. I vantaggi rispetto all'ELISA tradizionale sono numerosi: è più rapida, richiede minori quantità di antigene, la lettura non è influenzata da sieri emolitici o lipemici.

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

**Altri esami.** Di seguito sono riportate altre indagini eseguibili nella diagnosi di leishmaniosi:

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

realizzazione per la notevole difficoltà di reperire l'antigene sul mercato (49).

- Test di stimolazione linfocitaria. Consente di valutare l'immunità di tipo cellulo-mediata e quindi l'eventuale rilievo di deficit immunologici. L'esposizione di linfociti T ad un antigene, verso cui sono sensibilizzati, determina la loro trasformazione in cellule blastiche che può essere messa in evidenza valutandone l'aumento della sintesi del DNA, attraverso la misurazione dell'incorporazione di suoi precursori marcati radioattivamente (in genere timidina triziata o 5-bromo-2'-desossiridina). Maggiore è la reattività delle cellule all'antigene, maggiore sarà la loro reattività al termine della prova. Il rapporto tra la radioattività delle colture stimolate e la radioattività delle colture di controllo (non stimolate dall'antigene o dal mitogeno) viene denominato 'indice di blastizzazione o di stimolazione'. Questo fenomeno viene indotto anche in modo aspecifico da vari mitogeni quali la fitoemoagglutinina, e la concanavalina A (ConA). È opportuno sottolineare che i mitogeni non specifici, che si impiegano cioè per valutare la funzionalità linfocitaria, sono di solito in grado di trasformare circa il 60-90% dei linfociti dei soggetti sani.

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

- Determinazione di linfocine. Nel modello murino è possibile distinguere in maniera netta i soggetti in relazione alla risposta immunitaria nei confronti di *Leishmania infantum* (soggetti Th1 e soggetti Th2). Da ciò l'esigenza di approfondire la conoscenza del pattern di citochine prodotte dal cane in corso di malattia al fine di poter ottenere dati predittivi sull'evoluzione della stessa. In genere il profilo delle citochine prodotte viene determinato indirettamente con l'utilizzo di una *reverse transcriptase* PCR, una metodica che consente di evidenziare e semiquantificare l'mRNA che codifica le varie citochine,

## 1.9 TERAPIA

Gli obiettivi principali della terapia, sono innanzitutto determinare la guarigione dall'infezione, evitare o ritardare eventuali recidive, e migliorare le condizioni generali dei pazienti, cercando soprattutto di controllare tutte quelle alterazioni secondarie che si verificano in corso di leishmaniosi canina (ad esempio nefropatie).

Importante quindi, prima di iniziare la terapia, valutare le condizioni generali oltre che lo stato ematologico e soprattutto epato-renale: nei soggetti con un alto grado di insufficienza epatica e/o renale la terapia può risultare inutile o addirittura controproducente. Il grado di compromissione clinica dell'animale permette di ipotizzare l'efficacia della terapia.

Elemento indispensabile prima dell'attuazione della terapia, è quindi la corretta stadiazione del cane leishmaniotico, sia per meglio decidere il protocollo da improntare, ma soprattutto per avere una maggiore indicazione della prognosi prevista. Negli anni, sono state a questo proposito, effettuate varie classificazioni, attuate da diversi gruppi di studio, tra le più recenti e sicuramente utili ci sono quella proposta dal Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina (G.S.L.C) e quella proposta invece dal gruppo Leishvet (TABELLA 3 e TABELLA 4) (50,51).

TABELLA 3. Stadiazione dei cani affetti da leishmaniosi secondo linee-guida del G.S.L.C.

STADIO	DEFINIZIONE	DESCRIZIONE
A	Esposto	Cane senza alterazioni clinico-patologiche dimostrabili, nel quale i test diagnostici parassitologici risultino negativi ma siano evidenziabili titoli anticorpali specifici, non superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento. I cani esposti solitamente soggiornano o hanno soggiornato in un'area dove è accertata la presenza dei flebotomi.
B	Infetto	Cane senza alterazioni clinico-patologiche dimostrabili, nel quale è possibile mettere in evidenza il parassita, con metodi diretti (microscopia, coltura o PCR) e con metodi indiretti (presenza di anticorpi specifici).
C	Malato	Cane infetto, nel quale sia dimostrabile qualunque alterazione clinico-patologica riferibile a leishmaniosi e nel quale sia dimostrabile il parassita o titoli anticorpali superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento.
D	Malato con quadro clinico grave	Cane malato affetto da : (I) nefropatia proteinurica; (II) insufficienza renale cronica; (III) gravi malattie oculari che possono comportare la perdita funzionale e/o richiedano terapie immuno-depressanti; (IV) gravi malattie articolari che possano invalidare la funzione motoria e/o richiedano terapie immunodepressanti; (V)

		gravi malattie concomitanti di natura infettiva, parassitaria, neoplastica, endocrina o dismetabolica.
E	Refattario Recidivo	(Ea) Cane malato refrattario al trattamento  (Eb) Cane malato sottoposto a trattamento, con recidiva precoce.

TABELLA 4. Stadiazione dei cani affetti da leishmaniosi, secondo linee-guida del gruppo Leishvet

STADI	SIEROLOGIA	SEGNI CLINICI	ALTERAZIONI DI LABORATORIO
Stadio I Malattia Lieve	Livelli degli anticorpi negativi o bassi	Segni clinici lievi come linfadenomegalia o dermatite papulare	Di norma non sono osservate anomalie clinicopatologiche Profilo renale normale: creatinina < 1.4 mg/dl; non-proteinurico: UPC < 0.5
Stadio II Malattia moderata	Livelli di anticorpi da bassi ad alti	Cani che, oltre ai segni clinici elencati nello stadio I, possono presentare: lesioni cutanee diffuse o simmetriche come dermatite esfoliativa/onicogrifosi, ulcere (piano nasale, cuscinetti, prominenze ossee, giunzioni mucocutanee), anoressia, perdita di peso, febbre, ed epistassi	Anomalie clinicopatologiche come leggera anemia non rigenerativa, iperglobulinemia, ipoalbuminemia, sindrome da iperviscosità sierica Sottostadi a) Profilo renale normale: creatinina < 1.4 mg/dl; non-proteinurico: UPC < 0.5 b) Creatinina <1.4 mg/dl; UPC = 0.5-1
Stadio III Malattia grave	Livelli di anticorpi da medi ad alti	Cani che, oltre ai segni elencati negli stadi I e II, possono presentare segni causati da lesioni da immunocomplessi: vasculite, artrite, uveite e glomerulonefrite.	Anomalie clinicopatologiche elencate nello stadio II Insufficienza renale cronica (CKD), stadio 1 IRIS con UPC > 1 o stadio 2 (creatinina 1.4-2 mg/dl)

STADI	SIEROLOGIA	SEGNI CLINICI	ALTERAZIONI DI LABORATORIO
Stadio IV Malattia molto grave	Livelli anticorpali da medi ad alti	Cani con i segni clinici elencati nello stadio II. Tromboembolismo polmonare, o sindrome uremica e stadio finale della malattia renale	Anomalie clinicopatologiche elencate nello stadio II CKD, stadio 3 IRIS (creatinina 2-5 mg/dl) e stadio 4 IRIS (creatinina > 5 mg/dl) Sindrome uremica: marcata proteinuria UPC > 5

Tradizionalmente il trattamento della leishmaniosi canina prevede l'uso di antimoniali pentavalenti ( $Sb^{5+}$ ) somministrati per via sottocutanea, in particolare in Europa è utilizzato, sia sul cane che sull'uomo, l'antimoniato di N-metilglucammina che inibisce selettivamente gli enzimi protozoari necessari per l'ossidazione glicolitica e degli acidi grassi. La buona efficacia clinica del farmaco è testata da numerosi lavori; in genere si osserva una riduzione dei segni clinici in un intervallo di tempo variabile da pochi giorni ad alcune settimane, quasi sempre accompagnato dalla normalizzazione dell'emogramma e del profilo biochimico (50).

Altro farmaco usato spesso utilizzato in combinazione con gli antimoniali è l'allopurinolo che altera la traduzione delle proteine con effetti negativi sull'intero metabolismo del parassita (52;53). Questo farmaco è meno costoso del precedente, può essere dato per via orale ed ha pochi effetti collaterali.

L'associazione di N-metilglucammina , alla dose di 100 mg/Kg SID per 30 giorni, con allopurinolo (10 mg/kg BID ) è raccomandata per la fase di induzione della terapia. L'allopurinolo deve essere somministrato anche durante il mantenimento. Questa combinazione ha il vantaggio di abbreviare la durata della terapia con gli antimoniali e, inoltre, riduce le possibilità di recidive dopo la loro sospensione (54).

Anche gli agenti antimicrobici, specialmente l'amfotericina B, il ketoconazolo, e l'itraconazolo o altri farmaci antiprotozoari come il diminazene, sono stati utilizzati con successo variabile (55; 56; 57).

In modo particolare, l'amfotericina B lipo-associata è efficace nel trattamento delle persone con leishmaniosi viscerale resistente agli antimoniali (58); allo stato attuale questo è il trattamento d'elezione per la leishmaniosi umana in Italia.

L'aminosidina, un aminoglicoside, ha mostrato, una certa efficacia nel trattare i cani con infezione da *L.infantum* (57) ma l'uso ne è limitato dall'estrema nefrotossicità.

I glicocorticoidi sono talvolta utilizzati nel tentativo di controllare i fenomeni immunopatologici: prednisone e prendisolone a dosi non immunosoppressive (1-2 mg/kg al giorno per 40 gg). Tuttavia nel cane essi determinano un'inibizione dell'immunità cellulo-mediata che è alla base della resistenza dell'ospite all'infezione.

La pentamidina è un composto diamminico considerato fino a pochi anni fa, soprattutto in Francia, il farmaco di elezione nella terapia di alcune forme di leishmaniosi cutanea e mucocutanea dell'uomo ma anche di alcune forme di tripanosomiasi, per la sua buona attività antiprotozoaria e antifungina. Nel cane è utilizzata in alternativa, o in associazione, agli antimoniali pur non esistendo un effetto sinergico tra i due farmaci.

Le dosi suggerite sono di 4 mg/kg a giorni alterni, per un periodo di 3-4 settimane (59); quando adoperata in associazione ad antimonio di N-metilglucamina, viene somministrata un giorno la pentamidina ed un giorno il composto antimoniale per 24-30 giorni.

La Miltefosina (esadecil-fosfocolina) è un analogo dei fosfolipidi, composto da esteri con diverse catene lunghe sature ed insature di gruppi alchilici e la sua attività anti-*Leishmania* è determinata da alterazioni indotte al metabolismo dei fosfolipidi del parassita. La dose attualmente registrata nel cane è di 2 mg/kg una volta al giorno per os per 28 giorni. Il farmaco ha un assorbimento rapido e completo, una bassa clearance plasmatica, una

lunga emivita nei tessuti corporei, un'ampia distribuzione nei tessuti bersaglio, una lenta metabolizzazione epatica in colina e l'assenza di eliminazione per via renale. La combinazione tra la miltefosina e l'allopurinolo ha fornito risultati clinici e parassitologici del tutto sovrapponibili a quelli solitamente dimostrati dalla combinazione tra gli antimoniali e l'allopurinolo. A causa della sua tossicità sull'apparato riproduttore non dovrebbe essere somministrata a cagne gravide, in lattazione e destinate alla riproduzione (60).



## **CAPITOLO 2 – LA PREVENZIONE**

### **2.1 INTRODUZIONE**

Con il termine “prevenzione”, si intende l'applicazione di varie misure idonee a prevenire un atto infettivo, oppure l'effetto patologico di tale atto (61).

Nel caso della leishmaniosi canina, l'attuazione di una corretta profilassi ha il duplice scopo di prevenire l'attecchimento dell'infezione nel cane, e di salvaguardare la salute umana, trattandosi di una zoonosi. Nessun metodo preventivo ad oggi conosciuto, è in grado di conferire una protezione totale dalla leishmaniosi canina, di conseguenza la strategia migliore consiste nel combinare una o più di queste tecniche. Le metodiche attualmente utilizzate a scopo profilattico nei confronti della leishmaniosi canina sono: la lotta ai flebotomi vettori, la vaccinazione e l'utilizzo del domperidone.

### **2.2 LOTTA AI FLEBOTOMI VETTORI**

La lotta ai flebotomi può prevedere due tipi di intervento:

- 1) attuazione di campagne di bonifica tramite insetticidi: questo metodo presenta numerose limitazioni che lo rendono di difficile applicazione, in particolare, i costi elevati richiesti da campagne di questo tipo, e il rischio di insorgenza di fenomeni di resistenza agli insetticidi da parte dei flebotomi bersaglio (61);
- 2) protezione dei cani dalla puntura dei flebotomi: essa può innanzitutto essere attuata tramite una protezione meccanica, tenendo i cani in ricoveri muniti di zanzariere a maglie molto fitte, durante le ore di maggiore attività dei flebotomi, per tutta la durata del periodo di trasmissione dell'infezione. La metodica d'elezione, è tuttavia, l'impiego di sostanze chimiche, i piretroidi sintetici, direttamente sul cane. L'efficacia di questi principi è dovuta al

loro effetto anti-*feeding* che impedisce alla maggior parte dei flebotomi di effettuare il pasto di sangue, oltre ad un'azione insetticida su quelli che siano venuti a contatto col prodotto. Le sostanze attualmente utilizzate sono soprattutto permetrina e deltametrina, oggi in commercio in varie formulazioni e combinazioni, applicabili con spray, spot-on o come collari. Diversi studi hanno mostrato come l'impiego di insetticidi a base di permetrina e deltametrina (10,62,63) sia in grado di ridurre il rischio di infezione nei cani esposti.

Le misure preventive da adottare contro la puntura dell'insetto vettore sono intese non solo a prevenire la re-infezione di un soggetto infetto, ma soprattutto ad evitare che il cane leishmaniotico, anche se clinicamente guarito a seguito di terapia, continui ad essere serbatoio per i vettori di leishmaniosi. Infine, bisogna considerare che tali misure nei confronti del vettore italiano più competente (*P. perniciosus*) non hanno dimostrato una protezione totale (84-96%) e pertanto si raccomandano controlli periodici da effettuare diversi mesi dopo la stagione di trasmissione (64,65,66,67,68).

## **2.3 LA VACCINAZIONE**

In questi ultimi anni lo sviluppo delle tecnologie biomediche ha consentito la messa a punto di nuove strategie vaccinali, garantendo una maggiore efficienza nel prevenire malattie dell'uomo e degli animali e riducendo nel contempo indesiderati effetti collaterali (69). Tuttavia la natura di molti agenti infettivi è tale da permettere agli stessi di aggirare le difese immunitarie dell'ospite, che siano naturali od indotte dai vaccini, per cui ancora molta strada deve essere fatta per garantire la protezione immunitaria di numerose malattie dell'uomo e degli animali domestici (69). Quanto sopra detto appare evidente nel caso della ricerca di un vaccino nei confronti della leishmaniosi: nonostante decenni di studi, ad oggi i prodotti registrati come vaccini sono molto pochi, ed ancora numerose

ricerche sono condotte in merito. Tra i vaccini studiati nel corso degli anni nei confronti della leishmaniosi si possono distinguere vaccini di prima, seconda e terza generazione.

#### Vaccini di prima generazione:

I vaccini di 1° generazione sono quelli più antichi, attualmente utilizzati nei paesi meno avanzati in quanto facilmente preparabili e relativamente economici.

La loro preparazione si basa sul principio della leishmanizzazione attuato in passato in popolazioni euroasiatiche: i soggetti sani venivano immunizzati inoculando loro materiale proveniente da ulcere di persone infette. Attualmente questa metodologia è stata migliorata ottenendo preparazioni di parassiti ottenuti in coltura e uccisi con vari metodi (11). I vaccini di 1° generazione possono essere utilizzati sia con adiuvanti che senza ed inoltre è possibile applicarli a scopo terapeutico da soli o in associazione con antimoniali.

Si tratta di prodotti efficaci nell'attenuare lo sviluppo di forme cutanee aggressive e deturpanti nell'uomo. Vaccini di prima generazione sono stati usati anche per proteggere il cane dalla leishmaniosi viscerale. Un vaccino di questo tipo, allestito da *Leishmania major*, ha fornito risultati discordanti (70,71).

#### Vaccini di seconda generazione:

Possono essere inclusi in questo gruppo:

- Vaccini vivi modificati o deleti;
- Vaccini che utilizzano batteri o virus geneticamente modificati come veicoli;
- Vaccini basati su antigeni purificati di *Leishmania*
- Antigeni ricombinanti

Tra queste tipologie di vaccini, vanno in particolare ricordati i vaccini basati su antigeni purificati, ovvero ottenuti da proteine e lipofosfolipici dotati di potere immunogenico, selezionati da specie di *Leishmania* e che rappresentano una possibile futura soluzione vaccinale, unica limitazione al loro impiego su larga scala la difficoltosa produzione industriale.

Due antigeni rientranti in questa categoria sono stati sperimentati nella fase III mostrando dei risultati molto promettenti nel cane: *fucose mannose ligant* (FML) e LiESAp.

Il primo, utilizzato con saponine come adiuvanti, è un complesso glicoproteico, presente sui promastigoti e sugli amastigoti di *Leishmania donovani*, che partecipa nell'interazione tra il parassita e i macrofagi dell'ospite in maniera specie-specifica; esso è stato il primo vaccino registrato per la leishmaniosi canina (Leishmune®) e ad oggi commercializzato in Brasile. Il secondo antigene è il LiESAp ottenuto da *Leishmania infantum*, che, addizionato all'adiuvante Muramyl Dipeptide (MDP) è stato sperimentato nella Fase III con risultati discreti.

#### Vaccini di terza generazione:

Si possono annoverare:

- Vaccini a DNA , che utilizzano DNA complementare ( cDNA) che, veicolato da plasmidi vettori stimola la risposta immunitaria nelle cellule dei mammiferi. Ad oggi, nonostante i risultati incoraggianti anche nel cane, nessuno di questi vaccini è stato testato oltre le Fasi I e II, anche per l'assenza in questo campo di tecniche sufficientemente standardizzate.
- Vaccini basati su antigeni della "saliva" dei flebotomi : alcuni componenti della saliva dei flebotomi hanno mostrato proprietà immunomodulanti favorendo l'attecchimento del parassita, ciò ha permesso di creare vaccini nei loro confronti che sono risultati efficaci nel topo in seguito ad infezione sperimentale (11);
- Vaccini sintetici: si tratta più di una strategia da sviluppare che non di una realtà già perseguita. Negli ultimi anni si è appurato che i linfociti T CD4+ e CD8+ giocano un ruolo importante sia nella difesa dalla leishmaniosi che nella sua cura, identificare molecole capaci di stimolare efficacemente questi citotipi cellulari, potrà costituire la base per lo sviluppo di vaccini sintetici adeguati (11).

## 2.4 IL DOMPERIDONE

Il domperidone, è un derivato benzimidazolico antidopaminergico, antagonista competitivo della dopamina a carico dei recettori dopaminergici D2 del tratto gastroenterico e della zona chemio sensibile (CRTZ), di conseguenza è un farmaco utilizzato spesso per i suoi effetti antiemetici, pro cinetici, e dotato di scarsi effetti collaterali. Di recente, il domperidone ha acquisito un nuovo interesse in ambito veterinario, infatti è stato incluso nelle linee guida per il trattamento della leishmaniosi canina (60), nella lista dei farmaci anti-*Leishmania*.

Il domperidone ha la capacità di incrementare la prolattinemia: la prolattina è un ormone neuroendocrino prodotto dall'ipofisi, la cui funzione principale è quella di stimolare la produzione di latte a carico della ghiandola mammaria, essa è anche una citochina pro-infiammatoria in grado di indurre l'immunità cellulo-mediata (74). L'aumento della concentrazione di prolattina, induce l'incremento dei linfociti CD4+ Th1, e delle interleuchine IL-2, IL-12, dell'IFN- $\gamma$  e del TNF- $\alpha$  portando all'attivazione delle cellule natural killer (NK) e dei macrofagi (75, 76, 77). In corso di leishmaniosi canina, ciò comporta la stimolazione dell'immunità protettiva (Th1) (78) e riduzione di quella non protettiva (Th2) nei confronti dell'infezione.

Uno studio effettuato da Gomez-Ochoa et al. (2009) (79) ne ha testato l'efficacia quando utilizzato in monoterapia nel controllo e nella riduzione dei segni clinici e del titolo anticorpale in cani naturalmente infetti da *Leishmania infantum*.

Questo studio ha poi aperto la strada a successivi, volti a valutarne le potenzialità come prodotto a scopo profilattico. In particolare, è stato di recente presentato uno studio (80) il cui obiettivo era valutare l'efficacia del domperidone nella prevenzione della leishmaniosi

canina, in aree endemiche per la malattia. Lo studio, ha arruolato 90 cani padronali differenti per razza, sesso ed età, residenti in area endemica, risultati sieronegativi per la malattia e in buone condizioni di salute. Nessun cane ha ricevuto trattamenti con prodotti repellenti per gli insetti. Un gruppo di cani (44/90 cani) ha ricevuto vari cicli di trattamento con il farmaco, mentre un gruppo di cani (46/90 cani) non ha ricevuto nessun trattamento. Nell'arco dello studio i soggetti sono stati periodicamente monitorati clinicamente, con indagini ematologiche e sierologiche per la titolazione di anticorpi anti-*Leishmania infantum*. Lo studio ha mostrato come i soggetti sottoposti al trattamento a base di domperidone, abbiano mostrato segni clinici di leishmaniosi e titoli anticorpali anti-leishmania significativamente più bassi rispetto ai soggetti non trattati, sottolineandone l'efficacia come prodotto per la prevenzione della leishmaniosi canina in aree endemiche. E' utile sottolineare che mentre per gli effetti antidopaminergici del domperidone esiste una consolidata e nutrita bibliografia, soprattutto in campo umano, la letteratura esistente sulle azioni immunomodulanti nel cane dello stesso farmaco siano frammentarie e scarse, nonostante il farmaco sia attualmente registrato come unico immunomodulante da utilizzare a scopo profilattico e terapeutico nella leishmaniosi canina.

## CAPITOLO 3 – PARTE SPERIMENTALE

### 3.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO

La leishmaniosi canina è una malattia infettiva cronica ancor oggi oggetto di studio per numerosi aspetti che ne comprendono i meccanismi patogenetici, in parte non ancora del tutto chiariti, l'aspetto estremamente variabile delle sue manifestazioni e forme cliniche, e, soprattutto, le misure profilattiche e terapeutiche. Negli ultimi decenni numerosi progressi sono stati fatti nell'ambito dell'approccio terapeutico che, ad eccezione di alcune suscettibilità di razza ed individuali, consente di solito buoni risultati e permette il controllo della malattia per lunghi periodi, specialmente quando la terapia è attuata in tempo e con l'utilizzazione di protocolli standardizzati a livello internazionale. Di conseguenza, la ricerca è ad oggi particolarmente orientata alla prevenzione di questa patologia, e, come descritto nella parte introduttiva della presente tesi, le strategie preventive attuate riguardano sia la prevenzione dalle punture infettanti da parte dei flebotomi vettori che la ricerca e lo studio di nuovi vaccini o prodotti immunomodulanti che possano essere utili nell'evitare l'attecchimento dell'infezione. Lo scopo di questo studio è quello di valutare le capacità profilattiche di un farmaco immunomodulante, il domperidone, recentemente introdotto sul mercato europeo per la prevenzione dell'infezione da *Leishmania infantum* e la terapia degli stadi iniziali di malattia. In particolare, la tesi è volta a studiare l'incidenza dell'infezione nei soggetti trattati e ad esaminare, nei soggetti che abbiano sviluppato l'infezione, la progressione della malattia. E' utile premettere che i dati del presente studio devono essere considerati ancora non definitivi, essendo lo studio ancora in corso al momento della presente compilazione.

## **3.2 MATERIALI E METODI**

### **3.2.1 Disegno dello studio:**

Il sito di studio prescelto è un Comune della provincia di Napoli (Sant'Anastasia) situato nella zona vesuviana, notoriamente endemica sia per la CanL che per la ZVL (10,41). Lo studio è stato condotto in un canile privato dove i soggetti esaminati sono stati esposti all'infezione naturale per due stagioni consecutive di trasmissione (Luglio 2012 - Marzo 2014). Allo scopo di evitare di introdurre nello studio cani già infetti, anche attraverso trasmissione verticale, sono stati utilizzati n. 25 cani "naïve" di razza Beagle, provenienti da un'area del nord della Francia ritenuta libera da leishmaniosi. Tutti i cani sono stati trattati periodicamente con il farmaco oggetto dello studio e confrontati con un gruppo composto da 65 cani della stessa razza ed età, presenti nello stesso periodo nel sito dello studio, per un diverso studio sperimentale, e sottoposti allo stesso follow up.

### **3.2.2 Soggetti esaminati:**

Per lo studio, sono stati utilizzati 25 cani di razza Beagle, 12 maschi e 13 femmine, dell'età di 5-7 mesi, identificati tramite microchip e tatuaggio. Durante il periodo dello studio, ai fini di una più pratica identificazione dei soggetti, sono state utilizzate le ultime sei cifre del microchip di ogni cane. Condizioni indispensabili, per la scelta dei 25 soggetti da includere nello studio, sono state un buono stato di salute, e la condizione di naïve per leishmaniosi canina, che è stata ulteriormente accertata mediante test di immunofluorescenza indiretta, prima dell'introduzione nell'area di studio. I soggetti, sono stati divisi in due box in base al sesso, alimentati due volte al giorno, regolarmente trattati con prodotti antielmintici per gli endoparassiti gastrointestinali, e per tutta la durata dello studio, non hanno mai ricevuto trattamenti per gli ectoparassiti, né prodotti per la



prevenzione della puntura dei flebotomi vettori. Il controllo di possibili infestazioni da pulci o da zecche è stato ottenuto con mezzi meccanici ambientali. L'insorgenza di gravi patologie non correlate allo studio e che prevedessero trattamenti in grado di influenzare il decorso dell'infezione leishmanica (glicocorticoidi, tetracicline, interventi chirurgici particolarmente stressanti) ha previsto l'esclusione dallo stesso.

Ai fini dell'elaborazione della presente tesi sono stati utilizzati solo 20 soggetti (9 maschi e 11 femmine), in quanto altri 5 sono deceduti per motivi non correlati allo studio, in tempi eccessivamente precoci per poter essere utilizzati per l'analisi dei dati. Come gruppo di controllo, è stato utilizzato un gruppo di 65 cani, utilizzato per un altro progetto di ricerca, ma con caratteristiche analoghe: anche in questo caso si trattava di cani naïve, di razza Beagle, dell'età di 5 mesi, vissuti nello stesso canile, in box diversi, per lo stesso periodo e con le stesse modalità di gestione, compresa l'assenza di trattamenti per ectoparassiti e prodotti per la prevenzione dalla puntura dei flebotomi. Anche in questo caso, ai fini dell'elaborazione della tesi, dal gruppo iniziale di 65 cani, sono stati esclusi i soggetti deceduti per cause non correlate alla leishmaniosi canina, di conseguenza per l'analisi dei risultati, è stato considerato un numero finale di 53 cani appartenenti al gruppo controllo (23 maschi e 30 femmine).

### 3.2.3 Tempi:

Durante i due anni coperti dallo studio, i cani del gruppo in esame sono stati sottoposti al trattamento, alla visita e al prelievo di campioni secondo lo schema che segue:

TABELLA 1 - Disegno schematico dello studio, con tempi e tipi di prelievi.

MESE	DATA	TRATTAMENTO	VISITA CLINICA	PRELIEVO DI SANGUE PERIFERICO	PRELIEVO DI MIDOLLO	PRELIEVO LINFONODALE	PRELIEVO DI URINE
M0	06/2012	X	X	X	X		X
M1	07/2012		X			X	
M3	09/2012		X				
M4	10/2012	X					
M5	11/2012		X	X	X	X	X
M7	01/2013		X				
M8	02/2013	X					
M9	03/2013		X	X	X	X	X
M11	05/2013		X				
M12	06/2013	X					
M13	07/2013		X				
M15	09/2013		X				
M16	10/2013	X					
M17	11/2013		X	X	X	X	X
M19	01/2014		X				
M20	02/2014	X					
M21	03/2014		X	X	X	X	X

Come già accennato, i dati dei controlli successivi ad M17 non sono riportati nella presente tesi, per motivi temporali. Il controllo M0 è stato eseguito in Francia, per l'accertamento dello stato di salute e della negatività parassitologica.

Ai fini statistici sono stati valutati i risultati ottenuti dai controlli di seguito indicati, in cui erano previsti la visita clinica, i prelievi per l'esecuzione delle indagini ematologiche, biochimiche, urinarie e parassitologiche:

- M5
- M9
- M17

### **3.2.4 Somministrazione del farmaco:**

Il protocollo ha previsto due fasi di trattamento :

- 1) Una prima fase (M0), in area non endemica per leishmaniosi canina, dove i soggetti, una volta inclusi nello studio, sono stati sottoposti ad un primo mese di trattamento;
- 2) Una seconda fase, in area altamente endemica per leishmaniosi canina, per due stagioni di trasmissione, con lo schema di seguito riportato.

Il farmaco è stato somministrato per un totale di sei cicli di trattamento (M0, M4, M8, M12, M16, M20). Ogni ciclo ha avuto la durata di un mese, durante il quale ogni soggetto ha ricevuto il domperidone sotto forma di sospensione orale, ad un dosaggio di 0,5 mg/kg/die, per trenta giorni consecutivi.

### **3.2.5 Visita clinica:**

Ad intervalli regolari, i cani sono stati sottoposti a visita clinica, con lo scopo di valutare lo stato generale, lo stato di nutrizione, il peso, la temperatura corporea ed eventuali segni clinici imputabili alla leishmaniosi canina. In allegato la scheda. La visita clinica è stata eseguita nei mesi M1, M3, M5, M7, M9, M11, M13, M15, M17, M19, M21.

FIGURA 1 – Scheda clinica utilizzata durante l'esame fisico dei soggetti

Dog (indexel or tatoo)  Chronology : (months) M

**GENERAL EXAMINATION**

General condition  good  apathy  depression

Rectal temperature (°C)

Weight (kg)

Body condition scoring  1  2  3  4  5  
 emaciated thin moderate stout obese

**RECORDING OF CLINICAL SIGNS**

Clinical signs :  absence  presence \*

\* if presence, please answer to the following questions :

	absence	presence		absence	presence
Arthritis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Epistaxis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Skin signs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>If presence, please describe :</i>		
			Ulcers/nodules	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Exfoliative (furfuraceous) dermatitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Bilateral symetric alopecia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ocular signs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>If presence, please describe :</i>		
			Blepharitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Conjunctivitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Keratitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Uveitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Bilateral</b> lymph node (LN) and/or spleen enlargement	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>If presence, please describe :</i>		
			Spleen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Mandibular LN	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Pre-scapular LN	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Popliteal LN	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### **3.2.6 Prelievi e trattamento dei campioni:**

Nei mesi M5, M9 e M17 i cani, dopo esecuzione della visita clinica, sono stati sottoposti ai seguenti prelievi:

- Sangue periferico;
- Aspirato midollare;
- Prelievo linfonodale;
- Urine.

Dopo essere stati prelevati, i campioni sono stati adeguatamente conservati per il trasporto, per poi essere processati e stoccati.

#### **Sangue periferico**

Da ogni cane, dopo adeguata tricotomia e disinfezione della zona, sono stati ottenuti 12 ml di sangue periferico tramite prelievo dalla vena giugulare. Il sangue prelevato, è stato diviso in una provetta per EDTA e in due provette per siero con gel separatore. Ogni provetta è stata identificata indicando le ultime sei cifre del microchip del cane esaminato.

Ogni campione di sangue in EDTA, dopo lenta e costante miscelazione per 20 minuti, è stato utilizzato per effettuare l'esame emocromocitometrico.

Le provette di sangue con il gel separatore, dopo un tempo di attesa di almeno 20 minuti a temperatura ambiente, sono state sottoposte a centrifugazione ad una velocità di 3000 rpm per 10 minuti. Dopo centrifugazione il siero ottenuto è stato separato in tre differenti aliquote, ognuna opportunamente identificata con il numero del microchip del cane esaminato (ultime sei cifre), il tipo di campione (siero) e il mese di prelievo (MX), e successivamente stoccato in congelatore a -20 °C fino all'esecuzione degli ulteriori

esami:

- Un'aliquota è stata utilizzata per l'esame biochimico (urea, creatinina, ALT, AST, ALP). La metodica usata è stata di chimica secca tramite un analizzatore automatico (IDEXX Catalyst<sup>®</sup>);
- Un'aliquota è stata impiegata per la misurazione delle proteine totali e l'esecuzione del quadro proteico elettroforetico. Le proteine totali, sono state ottenuti con metodo biureto e analizzate tramite multi-analizzatore di chimica liquida SABA 18<sup>®</sup>; il quadro proteico elettroforetico è stato effettuato utilizzando strisce di acetato di cellulosa, e l'apparecchio impiegato (metodica manuale) è il Pratiga 2000 LC<sup>®</sup>.
- Un'aliquota è stata impiegata per l'esecuzione del test di immunofluorescenza indiretta (IFAT). La metodica viene di seguito descritta.

#### Test di immunofluorescenza indiretta:

*Preparazione dell'antigene.* L'antigene utilizzato era costituito da promastigoti di *L. infantum*, ceppo di riferimento OMS MHOM/TN/80/IPT1 (codice rapido di laboratorio: IPT1), coltivati in EMTM a 22°C. I parassiti, prelevati da tubi di terreno seminati da 3-4 giorni, sono stati lavati 3 volte in PBS pH=7,2 a 2.400 rpm per 20 min. Una volta ottenuta una sospensione della concentrazione adeguata, ne sono stati posti 25 µl per vetrino multi-spot (Sanofi Diagnostics Pasteur). Le gocce, seccate a temperatura ambiente, sono quindi state fissate con acetone freddo per 10 min.

*Esecuzione del test.* Sono state effettuate diluizioni a raddoppio del siero in esame, in PBS, a partire da 1:40 (considerato da alcuni autori il titolo minimo per la leishmaniosi del cane). Queste sono state successivamente apposte sull'antigene ed incubate in termostato a 37°C per 30 min. In ogni test sono stati utilizzati un siero di controllo positivo ed uno negativo per *Leishmania*. Dopo aver eseguito un lavaggio per 10 minuti in PBS, sul vetrino è stato posto l'antisiero costituito da globuline di coniglio anti-IgG di cane coniugate con isotiocianato di fluoresceina (SIGMA),

precedentemente titolate. La diluizione usata, effettuata con PBS, era di 1:100 con aggiunta di Bleu di Evans (1:4.000) come colorante di contrasto. Il vetrino è stato nuovamente posto in termostato a 37°C per 30 min. Dopo lavaggio in PBS per altri 10 minuti, sul vetrino sono stati collocati una goccia di glicerolo-PBS ed un coprioggetto.

La lettura è stata effettuata su microscopio a fluorescenza Leitz con ingrandimento 300.

### **Aspirato midollare.**

L'aspirato midollare è stato ottenuto mediante sternomiocentesi. Posto l'animale in decubito laterale con l'arto superiore flesso, è stata effettuata tricotomia e accurata disinfezione nella regione sternale, e, utilizzando una siringa da 10 ml, raccordata ad un ago sterile di 18 gauge, è stato eseguito il prelievo dalla seconda, terza o quarta sternebra. Per questa procedura gli animali sono stati sedati con una combinazione di Butorfanolo (0,4 mg/kg) e Metedomidina (10 µg/kg) endovena o intramuscolo, per evitarne dolore e stress. Il risveglio dei soggetti è stato poi accelerato tramite la somministrazione di Atipamezolo (0,05 mg/kg im).

Il volume di materiale midollare ottenuto per aspirazione lenta, era di circa fino 0,5 ml per cane, ogni campione è stato quindi conservato a -40°C in una provetta con anticoagulante (EDTA) per la successiva estrazione di DNA per la n-PCR, con metodica di seguito descritta.

### **Esecuzione delle indagini molecolari:**

*Estrazione del DNA.* Il DNA è stato estratto da ogni campione di midollo osseo mediante il kit Easy-DNA™ (Invitrogen, San Diego, CA, USA). A 350 µl di campione sono stati aggiunti 500 µl di soluzione A, tampone di lisi provvisto dal kit, omogenati per qualche secondo e incubati a 65°C per 6 min. Alla sospensione sono stati quindi aggiunti 900 µl di

cloroformio e, dopo opportuna agitazione, sono altri 200 µl di soluzione B, tampone di precipitazione, quindi è stata sottoposta a centrifugazione (13.000 rpm per 10 minuti) per ottenere la precipitazione del DNA.

La centrifugazione ha permesso di ottenere due fasi:

- a) il DNA in superficie, nella fase acquosa
- b) le proteine e i lipidi nell'interfaccia solida e il cloroformio nella parte inferiore.

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

PCR. La reazione di PCR utilizzata permette di identificare una sequenza ripetuta del SSU rRNA (72) (Figura 2).

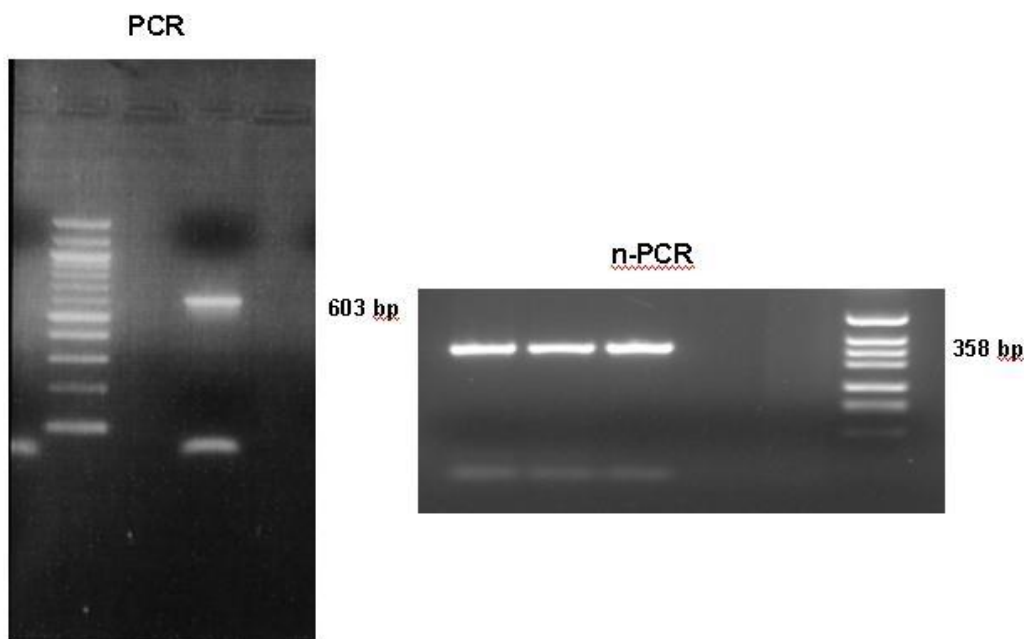


Figura 2. Prodotti di PCR e n-PCR della sequenza ripetuta del SSU rRNA di *Leishmania* ottenuti a partire da campione di midollo osseo di cane infetto

Per la prima reazione di amplificazione è stata utilizzata la coppia di primers R221 (5'GGTTCCTTTCCTGATTTACG3') e R332 (5'GGCCGGTA AAGGCCGAATAG5') il cui prodotto di amplificazione è di 603 bp.



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

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

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

Nested (n)-PCR. Nella seconda reazione di PCR (n-PCR) sono stati usati i primers R223 (5'TCCCATCGCAACCTCGGTT3') e R333 (5'AAAGCGGGCGCGGTG CTG3') il cui prodotto di amplificazione è di 358 bp (72) .

Per la n-PCR, la reazione è stata condotta in un volume finale di 50 µl contenente:

- a) 3 µl del prodotto della prima PCR,
- b) 25 µl di Master Mix (Promega),
- c) 50 pmol di ciascun primer R223 e R333
- d) il resto del volume con acqua bidistillata.

Le condizioni di temperatura di amplificazione usate erano uguali a quelle sopra descritte. Per ogni esperimento è stato effettuato un controllo negativo (senza "template") e un controllo positivo (con DNA "template" di *Leishmania*).

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

## Prelievo di linfonodo e coltura

Per ogni cane, dopo accurata palpazione, sono stati individuati i linfonodi poplitei ed esposti in posizione superficiale sottocutanea mediante forte pressione delle dita. In corrispondenza di tale area il pelo è stato rasato e la cute detersa. L'ago di una siringa da 2 ml contenente 0,5 ml di soluzione fisiologica sterile, è stato delicatamente infisso all'interno del linfonodo e la soluzione spinta con forza nel ganglio. Dopo aver fatto scorrere più volte l'ago al suo interno, in modo da provocare la rottura del tessuto linfatico, il materiale è stato aspirato ottenendo una sospensione ricca di frustuli, successivamente utilizzata per la semina, in condizioni di massima asepsi, in appositi terreni di coltura.

Terreno di coltura: Evans' modified Tobie's medium (EMTM): è un ricco terreno bifasico (73) costituito da una componente liquida e da una solida (agar-sangue). E' noto essere un buon terreno per l'isolamento e il mantenimento di tutte le specie di *Leishmania* descritte nel mondo.

La composizione della fase liquida è la seguente:

<b>TERRENO EMTM</b>	
<i>Fase liquida (pH 7,2)</i>	<i>g/L</i>
<i>KCl</i>	<i>0,4</i>
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,06</i>
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	<i>0,06</i>
<i>CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,185</i>
<i>MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,1</i>
<i>Mg Cl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,1</i>
<i>NaCl</i>	<i>8</i>
<i>L-Prolina</i>	<i>1</i>

La composizione della fase solida è la seguente:

<b>TERRENO EMTM</b>	
<i>Fase solida</i>	<i>g/L</i>
<i>Bacteriological peptone (Oxoid L37)</i>	5
<i>Beef extract (Oxoid Lab-Lemco L29)</i>	3
<i>NaCl</i>	8
<i>Agar (Oxoid purified)</i>	20

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

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

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

### **Prelievo di urine.**

Il prelievo di urine è stato effettuato ponendo il cane sul decubito dorsale e, dopo adeguata tricotomia e disinfezione della zona, poggiando una sonda microconvex a livello della regione inguinale, lungo la linea mediana. Una volta individuata la vescica, è stata utilizzata una siringa sterile da 5 ml per effettuare una centesi dell'urina. Le urine, conservate in apposite provette, sono state poi sottoposte a centrifugazione (1000 rpm per 10 minuti) e dopo tale procedura, ne è stato prelevato il surnatante, stoccato a -20° fino all'esecuzione della successiva indagine. L'analisi del valore di UPC è stata quindi eseguita, previo adeguato scongelamento del campione, attraverso metodica di chimica secca utilizzando un analizzatore automatico (IDEXX Catalyst<sup>®</sup>).

### **3.2.7 Statistica**

I test utilizzati sono stati il Fisher's exact test e il test di Mann-Whitney; il livello di significatività è stato posto a  $< 0.05$ .

### 3.3 RISULTATI

Per un'elaborazione più corretta dei dati, e per 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. Nello specifico, i soggetti sono stati classificati come segue (41):

- 1) **Negativo**: nessuna positività alle indagini parassitologiche per *Leishmania infantum*;
- 2) **Infezione Subpatente**: positività alla n-PCR midollare; titolo IFAT  $\leq$  1:160; coltura linfonodale negativa; assenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche attribuibili alla leishmaniosi canina;
- 3) **Infezione attiva asintomatica**: positività alla n-PCR midollare; titolo IFAT  $\geq$  1:160; positività alla coltura linfonodale; assenza di segni clinici e alterazioni clinico-patologiche imputabili a leishmaniosi canina;
- 4) **Infezione attiva sintomatica**: positività alla PCR midollare; titolo IFAT  $>$  1:160; positività alla coltura linfonodale; presenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche causate da *Leishmania infantum*.

Nella definizione dello stadio di infezione attiva sintomatica, e ai fini dell'ulteriore studio dell'evoluzione dei segni clinici nei soggetti che sono stati esaminati, sono state considerate come alterazioni clinico patologiche:

- anemia (ematocrito  $<$ 37%);
- trombocitopenia (piastrine  $<$ 200 x 10<sup>3</sup>/ml);
- aumento delle proteine totali (  $>$  7,7 g/dl);
- rapporto albumine/globuline  $<$  0,6;
- aumento di azotemia (  $>$ 50 mg/dl) e creatinina (  $>$ 1,5 mg/dl);

- rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC) > 0,5.

I segni clinici imputabili a leishmaniosi canina, sono stati classificati in cinque diverse categorie (41):

- **S**: segni clinici sistemici quali la perdita di peso e/o la riduzione del BCS; abbattimento del sensorio;
- **RE**: segni reticolo-endoteliali, ovvero la linfadenomegalia, bilaterale, a carico dei linfonodi sottomandibolari, pre-scapolari e poplitei, e/o la splenomegalia, valutata alla palpazione e all'esame ecografico;
- **C**: segni cutanei, tra cui la presenza di ulcere/noduli, di alopecia simmetrica bilaterale, di dermatite desquamativa;
- **O**: segni oculari, come blefarite, congiuntivite, uveite e cheratite.

Ai fini della valutazione finale, l'efficacia del farmaco nella prevenzione dell'infezione attiva è stata valutata considerando i soggetti che avessero sviluppato un'infezione attiva (asintomatica o sintomatica), in relazione a quanto assodato in lavori precedenti (41) che hanno evidenziato come l'infezione attiva asintomatica sia invariabilmente seguita da quella sintomatica. Lo studio della progressione della malattia e la relativa analisi dei segni clinici è stata ovviamente eseguita solo nei soggetti con infezione attiva sintomatica.

#### **VALUTAZIONE DELL'INFEZIONE NEL GRUPPO IN ESAME:**

Di seguito sono riportati i risultati delle indagini parassitologiche, emato-biochimiche e della visita clinica dei cani del gruppo di trattamento terapeutico. Dalle tabelle, si può evidenziare come, di 25 cani iniziali, siano stati inclusi nei risultati solo 20 cani, a causa dei decessi in fasi troppo precoci dello studio. Nella tabella n. 1 è riportato lo *status* di

infezione considerato nei diversi periodi di valutazione. Nella tabella n.2 sono riportati, per ogni soggetto classificato con infezione attiva asintomatica o sintomatica (numero totale: 7) i dati clinici e parassitologici.

TABELLA n.1: Classificazione dello *status* d'infezione nei cani del gruppo di trattamento

SOGGETTO	SESSO	MESE	IFAT	PCR	COLTURA	STATUS
1	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
2	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	<b>1/5120</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
3	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/80	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
4	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	<b>1/320</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
		M17				
5	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	<b>1/640</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
6	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	<b>1/160</b>	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	<b>1/1280</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
7	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/80	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	<b>1/2560</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
8	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	<b>1/10240</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
		M17				
9	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
10	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
11	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
12	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	<b>1/2560</b>	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>

<b>SOGGETTO</b>	<b>SESSO</b>	<b>MESE</b>	<b>IFAT</b>	<b>PCR</b>	<b>COLTURA</b>	<b>STATUS</b>
13	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
14	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
15	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
16	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	<b>1/640</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
		M17	Soggetto deceduto			
17	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
18	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	<b>1/320</b>	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
19	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
20	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO



**TABELLA n.2:** dati clinici e parassitologici dei cani del gruppo trattamento con infezione attiva asintomatica o sintomatica. Sono riportati i risultati delle indagini solo per i soggetti con infezione attiva

SOGGETTO	SESSO	MESE	IFAT	PCR	COLTURA	WBC	HTC	PLT	PT	A/G	AZO	CREA	UPC	SEGNI CLINICI	STATUS
2	M	M 5	negativa	negativa	negativa										NEGATIVO
		M 9	negativa	<b>positiva</b>	negativa										<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	<b>1/5120</b>	positiva	positiva	8	<b>29,3</b>	<b>50</b>	7	<b>0,3</b>	28	0,8	<0,10	<b>Perdita di peso, blefarite, aumento LN prescapolari</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA</b>
4	M	M 5	negativa	negativa	negativa										NEGATIVO
		M 9	<b>1/640</b>	<b>positiva</b>	<b>positiva</b>	13,7	42,5	447	5,9	0,9	28	0,7	<0,20	Assenti	<b>INFEZIONE ATTIVA ASINTOMATICA</b>
		M17	<b>Soggetto deceduto</b>												
5	M	M 5	negativa	negativa	negativa										NEGATIVO
		M 9	negativa	negativa	negativa										NEGATIVO
		M17	<b>1/640</b>	<b>positiva</b>	<b>positiva</b>	4,5	32,5	24	4,8	0,5	27	0,7	0,05	<b>linfadenomegalia prescapolari</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA</b>

SOGGETTO	SESSO	MESE	IFAT	PCR	COLTURA	WB C	HTC	PLT	PT	A/G	AZO	CREA	UPC	SEGNI CLINICI	STATUS
6	M	M 5	negativa	negativa	negativa										NEGATIVO
		M 9	<b>1/160</b>	<b>positiva</b>	negativa										<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	<b>1/1280</b>	<b>positiva</b>	<b>positiva</b>	9,9	38	84	8,4	0,5	19	0,9	nd	assenti	<b>INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA</b>
7	M	M 5	negativa	negativa	negativa										NEGATIVO
		M 9	1/80	<b>positiva</b>	negativa										<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	<b>1/2560</b>	<b>positiva</b>	<b>positiva</b>	10,3	33,3	215	5,4	0,2	70	1,1	4,39	assenti	<b>INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA</b>
8	M	M 5	negativa	negativa	negativa									linfadenomegalia prescapolari	NEGATIVO
		M 9	<b>1/10240</b>	<b>positiva</b>	<b>positiva</b>	8,5	35,3	54	8,9	0,3	10	0,8	0,04	linfadenomegalia prescapolari	<b>INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA</b>
		M17	<b>Soggetto deceduto</b>												

SOGGETTO	SESSO	MES E	IFAT	PCR	COLTURA	WBC	HTC	PLT	PT	A/G	AZO	CREA	UPC	SEGNI CLINICI	STATUS
16	F	M 5	negativa	negativa	negativa										NEGATIVO
		M 9	<b>1/640</b>	<b>positiva</b>	<b>positiva</b>	10,6	37,9	326	7,4	0,8	21	0,8	<0,20	<b>perdita di peso</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA</b>
		M17	<b>Soggetto deceduto</b>												

Di seguito vengono riportati (tabella n. 3) le percentuali delle categorie dei segni clinici e delle alterazioni clinico-patologiche riscontrate nel gruppo dei trattati. Nella tabella sono stati inclusi i segni che si sono manifestati a M9 e a M17, nei cani con infezione attiva sintomatica. I cani considerati a M17 sono in numero totale di 6, poiché uno è deceduto per leishmaniosi prima del controllo.

TABELLA n.3: segni clinici (%) riscontrati a M9 e M17 nei cani trattati, con infezione attiva sintomatica.

<b>SEGNI CLINICI</b>	<b>M9 (TOT CANI CON INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA: 2)</b>	<b>M17 (TOT CANI CON INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA: 6)</b>
<i>SEGNI SISTEMICI</i>		
Perdita di peso	1 (50%)	2 (33%)
<i>SEGNI RETICOLO-ENDOTELIALI</i>		
Linfoadenomegalia	1 (50%)	3 (50%)
<i>SEGNI OCULARI</i>		
Blefarite		1 (16,6%)
<i>ALTERAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE</i>		
Anemia	1 (50%)	4 (66,6%)
Piastrinopena	1 (50%)	3 (50%)
Aumento PT	1 (50%)	3 (50%)
A/G diminuito	1 (50%)	4 (66,6%)
Azotemia		1 (16,6%)
UPC aumentato		1 (16,6%)

## **VALUTAZIONE DELL'INFEZIONE NEL GRUPPO CONTROLLO:**

Di seguito sono riportati i risultati delle indagini parassitologiche, emato-biochimiche e della visita clinica dei cani del gruppo controllo. Analogamente a quanto descritto per il gruppo di trattamento, nelle tabelle sono stati riportati solo 53 cani su 65, poiché 12 sono deceduti in fasi precoci, per problematiche non imputabili allo studio in corso. Nella tabella n. 3 è riportato lo *status* di infezione considerato nei diversi periodi di valutazione. Nella tabella n. 4 sono riportati, per ogni soggetto classificato con infezione attiva asintomatica o sintomatica (numero totale: 8) i dati clinici e parassitologici.

TABELLA n.4: Classificazione dello *status* d'infezione nei cani del gruppo controllo

<b>SOGGETTO</b>	<b>SESSO</b>	<b>MESE</b>	<b>IFAT</b>	<b>PCR</b>	<b>COLTURA</b>	<b>STATUS</b>
1	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
2	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
3	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
4	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
5	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	<b>1/10240</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
6	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
7	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
8	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
9	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
10	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
11	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
12	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO

SOGGETTO	SESSO	MESE	IFAT	PCR	COLTURA	STATUS
13	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
14	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
15	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
16	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
17	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	<b>1/320</b>	Negativa	Negativa	NEGATIVO
18	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
19	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
20	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
21	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
22	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
23	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
24	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO

SOGGETTO	SESSO	MESE	IFAT	PCR	COLTURA	STATUS
25	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
26	F	M 5	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	<b>1/640</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
27	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
28	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
29	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
30	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
31	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	<b>1/160</b>	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
32	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
33	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
34	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	<b>1/160</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
35	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	<b>1/640</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
		M17	Soggetto deceduto			
36	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	<b>1/160</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>



SOGGETTO	SESSO	MESE	IFAT	PCR	COLTURA	STATUS
37	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
38	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
39	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	<b>1/1280</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
40	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
41	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
42	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
43	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
44	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	<b>1/160</b>	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
45	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/80	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
46	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
47	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
48	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO

<b>SOGGETTO</b>	<b>SESSO</b>	<b>MESE</b>	<b>IFAT</b>	<b>PCR</b>	<b>COLTURA</b>	<b>STATUS</b>
49	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>INFEZIONE SUBPATENTE</b>
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
50	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
		M17	<b>1/40960</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA</b>
51	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
52	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
53	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa	NEGATIVO
		M17	1/80	Negativa	Negativa	NEGATIVO

TABELLA n.5: dati clinici e parassitologici dei cani del gruppo controllo con infezione attiva asintomatica o sintomatica

SOGGETTO	SESSO	MESE	IFAT	PCR	COLTURA	WBC	HTC	PLT	PT	A/G	AZO	CREA	UPC	SEGNI CLINICI	STATUS
5	M	M 5	Negativa	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M17	<b>1/10240</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	15,1	<b>34,4</b>	<b>196</b>	7,9	0,42	<b>88</b>	1,1	<b>&gt;3,42</b>	Assenti	<b>INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA</b>
26	F	M 5	1/80	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M17	<b>1/640</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	9,6	41,6	327	6,1	<b>1,01</b>	30	0,8	<0,20	Assenti	<b>INFEZIONE ATTIVA ASINTOMATICA</b>
34	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M17	<b>1/160</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	10	40	210	6,1	1,06	26	0,7	<0,20	assenti	<b>INFEZIONE ATTIVA ASINTOMATICA</b>

SOGGETTO	SESSO	MESE	IFAT	PCR	COLTURA	WBC	HTC	PLT	PT	A/G	AZO	CREA	UPC	SEGNI CLINICI	STATUS
35	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M 9				17	37,2	311					<0,5	assenti	<b>INFEZIONE ATTIVA ASINTOMATICA</b>
		M17	Soggetto deceduto												
36	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M 9	1/80	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M17				11,3	41	351						<0,20	assenti
			<b>1/160</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>				5,9	<b>1,06</b>	15	0,6			
39	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M 9	1/40	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M17				7,3	40,3	210						<0,20	Linfoadenomegalia prescapolari
			<b>1/1280</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>				6,3	0,84	21	0,7			

SOGGETTO	SESSO	MESE	IFAT	PCR	COLTURA	WBC	HTC	PLT	PT	A/G	AZO	CREA	UPC	SEGNI CLINICI	STATUS
45	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M 9	Negativa	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M17	1/80	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	11,7	45,3	213	5,6	<b>0,89</b>	21	0,7	<0,20	<b>Linfoadenomegalia prescapolari</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA</b>
50	F	M 5	Negativa	Negativa	Negativa										NEGATIVO
		M 9	Negativa	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	13,2	40,3	347	5,8	0,87	26	0,8	<0,20	assenti	<b>INFEZIONE ATTIVA ASINTOMATICA</b>
		M17	<b>1/40960</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	13,4	29,2	134	9,6	0,29	26	0,6	0,1	<b>Linfoadenomegalia prescapolari e poplitei</b>	<b>INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA</b>

Di seguito vengono riportati (TABELLA n. 6) le percentuali delle categorie dei segni clinici e delle alterazioni clinico-patologiche riscontrate nel gruppo controllo. Nella tabella sono stati inclusi i segni che si sono manifestati a M9 e a M17, nei cani con infezione attiva sintomatica.

TABELLA n.6: segni clinici (%) riscontrati nel gruppo controllo a M9 e M17, nei cani con infezione attiva sintomatica

<b>SEGNI CLINICI</b>	<b>M9 (NESSUN CANE CON INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA)</b>	<b>M17 (TOT CANI CON INFEZIONE ATTIVA SINTOMATICA: 4)</b>
<i>SEGNI RETICOLO-ENDOTELIALI</i>		
linfadenomegalia		3 (75%)
<i>ALTERAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE</i>		
Anemia		3 (75%)
Piastrinopena		3 (75%)
Aumento PT		2 (50%)
A/G ratio invertito		2 (50%)
Azotemia		2 (50%)
UPC ratio		2 (50%)

I risultati riportati nelle tabelle mettono in evidenza diversi aspetti:

- Nel gruppo in esame (20 cani sottoposti al trattamento) a M5 tutti i cani sono risultati negativi (100%), mentre a M9, 12/20 (60%) sono rimasti negativi, 5/20 (25%), sono risultati subpatenti, 1/20 (5%) ha sviluppato lo stadio di infezione attiva asintomatica e 2/20 (10%) infezione attiva sintomatica. Al controllo successivo, M17, sono stati valutati 17/20 cani, perché 3 cani leishmaniotici sono morti, 2 dei quali già sintomatici; di conseguenza, nelle valutazioni dei segni clinici di seguito riportate, i 2 soggetti sintomatici sono stati considerati come se fossero arrivati al tempo M17. In definitiva, al tempo finale di valutazione 11/20 cani (55%) sono rimasti negativi, 2/20 cani (10%) hanno sviluppato infezione subpatente, 1/20 cani (5%) ha mostrato infezione attiva asintomatica (ma era deceduto in precedenza), e 6/20 (30%) infezione attiva sintomatica.
- Nel gruppo controllo (53 cani) a M5 tutti i soggetti sono rimasti negativi, mentre a M9 48/53 (90,5%) sono risultati negativi mentre 3/53 (6%), subpatenti e 2/53 (4%) hanno sviluppato infezione attiva asintomatica. Al controllo successivo, M17, sono stati valutati 52/53 cani, perché un cane è deceduto per leishmaniosi; di conseguenza, nelle valutazioni dei segni clinici di seguito riportate, il soggetto è stato considerato come se fosse arrivato al tempo M17. Al tempo finale di osservazione, quindi, 41/53 (79%) cani sono rimasti negativi, 4/53 (7,5%) cani hanno sviluppato infezione subpatente, 4/53 (7,5%) cani hanno mostrato infezione attiva asintomatica, e 4/53 (7,5%) infezione attiva sintomatica.

Il confronto statistico tra i due gruppi per quanto riguarda la comparsa di infezioni attive nell'arco dello studio (Gruppo di trattamento: 7 cani con infezioni attive -35.0%-); Gruppo controllo : 8 cani con infezioni attive – 15.1%) è risultato ai limiti della significatività ( $p=0.06$ ).

Un dato che emerge come preponderante è la differenza d'insorgenza di infezioni attive nei due sessi nel gruppo dei trattati: alla fine dello studio 6 maschi/9 hanno sviluppato questo tipo d'infezione, contro 1 femmina/10. All'esame statistico tale differenza è apparsa altamente significativa ( $p < 0.01$ ). Nel gruppo controllo invece la differenza di infezioni attive tra maschi (1/9) e femmine (7/23) è risultata ai limiti della significatività ( $p=0.06$ ).

Per quanto riguarda i dati derivanti dallo studio della comparsa dei segni clinici, si può evidenziare come nel gruppo dei trattati 2/6 (33,3%) soggetti hanno manifestato segni clinici e/o alterazioni clinico patologiche già ad M9, al contrario del gruppo controllo, nel quale non sono state registrate infezioni attive (0/4) nello stesso tempo del follow up.

Per quanto riguarda la qualità e quantità dei segni clinici, delle alterazioni ematobiochimiche ed urinarie osservate, non sono state registrate differenze significative tra i due gruppi in esame.



## DISCUSSIONE

Come accennato in premessa, i risultati derivanti dal presente studio devono essere considerati non definitivamente conclusivi, poiché al momento del deposito degli atti lo studio era ancora in corso. Nonostante questo limite, l'analisi dei dati permette alcune considerazioni che dovrebbero indurre i Medici Veterinari ad una maggiore consapevolezza nell'applicazione terapeutica e profilattica del farmaco. Le proprietà profilattiche del farmaco nei confronti dell'infezione da *Leishmania infantum*, infatti, non sono emerse dal presente studio nel quale cani "naive" di razza Beagle sono stati esposti ad infezione naturale per due stagioni consecutive di trasmissione, in un'area italiana particolarmente endemica. L'elevata endemicità della zona scelta per lo studio è stata confermata dal numero totale di infezioni attive che alla fine hanno fatto registrare un'incidenza cumulativa in tutti i cani studiati pari al 20,54%. Questo dato conferma quanto riportato in letteratura, sulla percentuale di cani esposti all'infezione che sviluppano malattia (51) in aree endemiche. Il dato più sorprendente è sicuramente dato dalla mancata azione protettiva offerta dal farmaco nei confronti dell'infezione, come dimostrato dal numero di animali con infezione attiva, percentualmente superiore al gruppo controllo, anche se al limite della significatività statistica. Gli scarsi dati esistenti in letteratura e la mancanza, nel nostro studio, di valutazione della risposta immunitaria del gruppo dei trattati non consentono un'analisi dettagliata dei fattori che possono aver contribuito alla mancata azione profilattica del farmaco. Sicuramente in futuro dovranno essere meglio approfonditi la capacità della prolattina di assicurare un'azione immunostimolante Th1 in cani giovani, di razze diverse compreso il beagle e sottoposti ad una condizione di vita di gruppo che sicuramente può favorire condizioni stressanti in grado di

limitare la risposta immunitaria cellulo-mediata. E' vero anche, tuttavia, che il farmaco è a tutt'oggi commercializzato senza alcuna limitazione applicativa per razze e condizioni di vita. Un altro dato che emerge dal presente studio è la comparsa di malattia nel 66,6% dei maschi considerati, significativamente molto più elevata che nelle femmine. Anche in questo caso, il ruolo della prolattina nel maschio, ed in particolare nei maschi di razza beagle dovrebbe essere meglio approfondito, per confermare la capacità immunostimolante nel medio-lungo periodo. Non è da escludere, inoltre, che il blocco dei recettori dopaminergici con conseguente induzione di picchi prolattinici non fisiologici possa indurre anomalie neuromonali in grado di produrre effetti negativi sull'etologia di animali tenuti in gruppo per molti mesi, con conseguente stress cronico. Fattori questi che pur esulando dagli obiettivi del presente studio, andranno senza dubbio approfonditi in futuro. Un altro aspetto che dovrebbe essere meglio studiato è l'incapacità del farmaco, nelle presenti condizioni sperimentali, di contrastare l'evoluzione dell'infezione verso stati palesi di malattia. Nei cani trattati, infatti, si è assistito ad una comparsa più precoce di malattia con la presenza e la progressione di segni clinici ed alterazioni ematobiochimiche ed urinarie perfettamente sovrapponibili a quelle osservate nel gruppo controllo. Questo dato, pur con le limitazioni dello studio messe in evidenza in precedenza, pone alcuni interrogativi anche sulle proprietà terapeutiche del farmaco negli "stadi iniziali" di malattia, che dovrebbero essere meglio precisati e confermati da ulteriori studi. Il domperidone utilizzato ai dosaggi e per i tempi indicati in precedenza si è dimostrato ben tollerato e di facile somministrazione. Nonostante le somministrazioni ripetute nel tempo, non sono state registrate azioni clinicamente evidenti sul ciclo estrale delle cagne, né la comparsa di false gravidanze.

In conclusione, sembra opportuno sottolineare che le proprietà profilattiche e terapeutiche del domperidone nei confronti dell'infezione da *Leishmania infantum* nel cane dovrebbero essere studiate in maniera più approfondita, prima di proporre l'utilizzo

su vasta scala, in particolare in zone ad elevata endemia, in soggetti giovani specialmente di sesso maschile e sottoposti a regime di vita in gruppo.

# BIBLIOGRAFIA

- 1) **Marcato P.S., Macri B., Burdisso R. (2002).** Granulomi da protozoi in: Paolo Stefano Marcato. Patologia sistematica veterinaria. *Edagricole, Bologna*
- 2) **Gramiccia M., Gradoni L. (2005).** The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology 35: 1169–1180.*
- 3) **WHO (1993).** The Leishmaniasis. CTD/MIP/WP.93.8, WHO/HQ. Geneva.
- 4) **Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al.** Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE. 2012;7(5):e35671. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> PMID:22693548 PMCID:PMC3365071
- 5) **Pampiglione S. and Bettini S. (1981).** Bibliografia delle Leishmaniosi. *Ann. Ist. Sup. Sanità 17: 1–150*
- 6) **Pozio E, Gradoni L, Gramiccia M:** La leishmaniosi canina in Italia dal 1910 a 1983. *Ann Parasitol Hum Comp, 60:543-553, 1985.*
- 7) **Bettini S., Gramiccia M., Gradoni L., Atzeni M.C. (1986).** Leishmaniasis in Sardinia. II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in the province of Cagliari. *Trans. R. Soc. Med. Hyg., 80: 458- 459.*
- 8) **Natale A. (2004).** La leishmaniosi in Italia. *Obiett. Doc. Vet. 12: 23-28.*
- 9) **Gradoni L, Gramiccia M, Houry C, et al.** Linee guida per il controllo del serbatoio canino della leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. *RAPPORTI ISTATI, 2004 (04/12), 1-17.*
- 10) **Maroli M, Mizioni V, Siragusa C, D’Orazi A, Gradoni L:** Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol 15; 358-363, 2001.*
- 11) **Autori vari.** Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione (2010). Edizioni veterinarie.
- 12) **Bettini S., Gramiccia M., Gradoni L., Atzeni M.C. (1986).** Leishmaniasis in Sardinia. II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in the province of Cagliari. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80: 458–459.*
- 13) **Maroli M, Gramiccia M, Gradoni L, Troiani M, Ascione R.,** Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* with MON 72 zymodeme of *Leishmania infantum* in the Campania region of Italy. 1994 Sep;57(4):333-5.
- 14) **Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W..** Parassitologia Veterinaria. Edizione italiana a cura di Claudio Genchi. UTET, 1998.
- 15) **Day MJ.** The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasit Vectors.* 2011 Apr 13;4:48. doi: 10.1186/1756-3305-4-48.
- 16) **Ribeiro J.M.** – Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? – *Infect. Agents Dis.* 1995 Sep; 4(3):143:52
- 17) **Solano-Gallego L.** What is new on host-parasite interaction and immunity in canine Leishmaniasis? Acts of International SCIVAC congress. “Canine leishmaniasis and other vector-borne diseases:our current state of knowledge. March 8th -10th 2013 - Pisa – Italy

- 18) **Loría-Cervera EN, Andrade-Narváez FJ.** Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014 Jan-Feb;56(1):1-11. doi: 10.1590/S0036-46652014000100001.
- 19) **Reed S.G. and Scott P. (1993).** T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Op. in Immunol.* 5: 524-531.
- 20) **Buonaccorsi (1995).** Le malattie del cane e del gatto. Ed. "Essegi", Bologna
- 21) **Font A., Roura X., Fondevila D., Closa J.M., Mascort J., Ferrer L. (1996).** Canine mucosal leishmaniasis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*32: 131-137.
- 22) **Kontas V.J. and Koutinas A.F. (1993).** Old world canine leishmaniasis. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* 15: 949-960.
- 23) **Koutinas AF., Scott DW., Kantos V., et al. (1992).** Skin lesions in canine Leishmaniasis (Kala-azar): A clinical and histopathological study of 22 spontaneous cases in Greece. *Vet. Dermatol.* 3: 121-130.
- 24) **Pena M.T., Roura X.,Davidson M.G., (2000).** Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs : 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol,* 3 (1):35-41
- 25) **Pugliese A., Niutta P.P., Meli F., Pantano V. , Giudice E., (1992) .** Incidenza di lesioni oculari in corso di Leishmaniosi del cane. *Atti S.I.S. Vet.* 46:1529-1533
- 26) **Buracco P., Abate R., Guglielmino R., Morello E. (1997).** Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with leishmania donovani infection in dog. *J. of Anim. Pract.*
- 27) **Ferrer L. (1992).** Leishmaniosis Kirk's current veterinary therapy XI, ed. W.B. Saunders. Philadelphia: 266-270.
- 28) **Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, et al.:** Glomerular lesions in dogs infected with Leishmania organisms. *Am J Vet Res* 64:558-561,2003.
- 29) **Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, et al.:** Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 20:228-233,2006
- 30) **Rallis, T.; Day, M.J.;Saridomichelakis, M.N. et al.** Chronic hepatitis associated with Canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J. Comp. Pathol., v.132,p.145-152, 2005.*
- 31) **Adamama-Moraitou,Timoleon S., Rallis S, Koytinas A, Tontis D, Plevraki K, Kritsepi M.** Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am. J. Trop. Med. Hyg., 76(1), 2007, pp. 53-57*
- 32) **Vamvakidis C. D, Koutinas A. E, Saridomichelakis M., Kanakoudis G and Georgiadis G.,** Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Record* 2000;146:698-703
- 33) **Foglia Manzillo V., Paparccone R., Cappiello S., De Santo R., Bianciardi P., Oliva G. (2009).** Resolution of tongue lesions caused by *Leishmania infantum* in a dog treated with the association miltefosine-allopurinol. *Parasit Vectors.* 26;2 Suppl 1:S6.
- 34) **Castagnaro M., Crotti A., Fondati A., Gradoni L., Lubas G., Maroli M., Oliva G., Paltrinieri S., Solano-Gallego L., Roura X., Zatelli A., Zini E. -** Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte I: Approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico -- *Veterinaria* 21(3):19-31, 2007 ISSN 0394-3151 21"

- 35) **Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, Francino O**: Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered* 96(7):755-758, 2005.
- 36) **Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, Consenti B, et al.**: Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur J Epidemiol* 8(2):273-276, 1992.
- 37) **Fisa R, Gallego M, Castillejo S, Aisa MJ, et al.**: Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83(2):87-97, 1999.
- 38) **Shiddo, S. A. (1995)**. *Visceral leishmaniasis in Somalia: immunodiagnostic and epidemiological aspects*. PhD thesis, Swedish Institute for Infectious Disease Control.
- 39) **Keenan CM., Hendricks LD., Lightner L., Webster HK., Johnson AJ. (1984)**. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology *Vet Pathol.* 21(1):74-9
- 40) **Ciaramella P., Oliva G., Luna RD., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A., Persechino A. (1997)**. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.* 22;141(21):539-43.
- 41) **Foglia Manzillo V, Di Muccio T, Cappiello S, Scalone A, Papparcone R, Fiorentino E, Gizzarelli M, Gramiccia M, Gradoni L, Oliva G**. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 May 9;7(5):e2225. doi: 10.1371/journal.pntd.0002225. Print 2013.
- 42) **Cortes S, Rolao N, Ramada J, Campino L**: PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98 (1): 12-17, 2004.
- 43) **Gradoni, 2002**. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Canine leishmaniasis: moving towards a solution*. Ed. R Killick-Kendrick Intervet International, Boxmeer, NL.
- 44) **Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR**: Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 40:2352-2356, 2002.
- 45) **Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, et al.**: Evaluation of enzymelinked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 43:5515-5519, 2005.
- 46) **Dye C., Vidor E., Dereure J. (1993)**. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol Infect.* 110: 647-656.
- 47) **Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A**: Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 59:13-21, 1995.
- 48) **Gradoni L, Gramiccia M**: Leishmaniasis, In *OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccine*, 4th ed. Office International des Epizooties, Paris, France, 2000 p. 803-812.
- 49) **Moody AH., el-Safi SH. (1996)**. A latex agglutination test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Oct;90(5):522.
- 50) **Oliva G., Roura X., Crotti A., Zini E., Marosi M., Castagnaro M., Gradoni L., Lubas G., Paltrinieri S., Zatelli A.** - Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte II: Approccio terapeutico - *Veterinaria* 22 (6): 9-20, 2008

- 51) **Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G**, The LeishVet Group LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2011 May 20;4:86.
- 52) **Alvar J., Molina R., San Andres M., Tesouro M., Nieto J., Vitutia M., Gonzalez F., San Andres M.D.,Boggio J., Rodriguez F., Sainz A., Escacena C. (1994)**. Canine leishmaniosis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 88, 371–378.
- 53) **Sundor S., Rosenkaimer F., Murray H.W. (1994)**. Successful Treatment of refractory visceral leishmaniasis in India using antimony plus interferon- $\gamma$ . *J. Infect. Dis*. 170: 6559-6562.
- 54) **Denerolle P., and Bourdoiseau G. (1999)**. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniosis (96 cases). *J. Vet. Int. Med*. 13, 413–415.
- 55) **Lamothe J. (1997)**. A new prospecton canine leishmaniasis:traetment with amphotericin B. *Prat. Med. Churg. Anim. Comp*. 32: 133-141.
- 56) **Oliva G., Gradoni L., Ciaramella P., De Luna R., Cortese L., Orsini S., Davidson R.N., Persechino A. (1995)**. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dog naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Antimicrob. Chemother*. 36: 1013–1019.
- 57) **Poli A., Sozzi S., Guidi G., Bandinelli P., Mancianti F. (1997)**. Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol*. 71: 263-271
- 58) **Barman J.D. (1997)**. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis*. 24: 684-703.
- 59) **Euzeby J. (1982)**. Thérapeutique de la leishmaniose générale du chien. Actualité - Perspectives. *Revue de Médecine Vétérinaire* 133: 383-390.
- 60) **Oliva G, Dvm XR., Crotti A., Maroli M., Castagnaro M., Gradoni L., Lubas G., Paltrinieri S., Zatelli A., Zini E. (2010)**. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*.1;236(11):1192-8. Review
- 61) **Maroli M., Gradoni L., Oliva G., Castagnaro M., Crotti A., Lubas G., Paltrinieri S., Roura X., Zatelli A., Zini E.** - Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte III: Prevenzione – *Veterinaria* 23 (4): 19-26, 2009 ISSN 0394-3151 23”
- 62) **Reithinger R,Teodoro U,Davies CR**:Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerg Infect Dis* 7; 872-876, 2001.
- 63) **Ferroglio E, Poggi M, Trisciuglio A**. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health* 55(3); 145-148, 2008
- 64) **Asher F, Alves-Pires C, Campos C, Capela MJ, Aguiar P**: Protective effect of a permethrin + pyriproxyfen spray against *Phlebotomus perniciosus* bite. *Proceedings of IX International Congress of Parasitology, Japan August 24-28 1998*. Monduzzi Editore, 1039-1042, 1998.
- 65) **Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech M-P, Cadiergues MC**: Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 11; 105-111, 1997.
- 66) **Mencke N,Volf P,Volfova V, Stanneck D**: Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) on dogs. *Parasitol Res* 90; S108-S111, 2003.

- 67) **Lucientes J:** Laboratory observations on the protection of dogs from the bites of *Phlebotomus perniciosus* with Scalibor® Protector Bands: preliminary results. In: Killick-Kendrick R (Ed.). *Canine Leishmaniasis: an update*. Wiesbaden: Hoechst Roussel Vet; 92-94, 1999.
- 68) **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* 159(7); 206-209, 2006.
- 69) **Cavirani S., Martelli P. (2003).** La vaccinazione. Un approccio filosofico e tecnico alla strategia sanitaria. In *le vaccinazioni in medicina veterinaria.strategie per la profilassi delle malattie degli animali domestici. Ed agricole*
- 70) **Genaro O., Pinto JA., Da Costa CA., Franca-Silva JC., Costa RT., Silva JC., et al. (1996).** Phase III randomized double blind clinical trial on the efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:116.
- 71) **Mohebbali M., Khamesipour A., Mobedi I., Zarei Z., Fesharki RH. (2004).** Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine*;22:4097-4100.
- 72) **Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB.** Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol.* **1992** Mar;51(1):133-42.
- 73) **Evans D.A. (1987).** *Leishmania in vitro methods for parasites cultivation* . Taylor A.E.E. and Baker J.R. eds ., pp. 58-59 ; Academic Press, Londra and New York.
- 74) **Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G (2000)** Prolactin: structure,function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80 1523–1631.
- 75) **Di Carlo, R., Meli, R., Galdiero, M., Nuzzo, I., Bentivoglio, C.,Carratelli, C.R., 1993.** Prolactin protection against lethal effects of *Salmonella typhimurium*. *Life Science* 53, 981–989
- 76) **Richards, S.M., Garman, R.D., Keyes, L., Kavanagh, B., McPherson,J.M., 1998.** Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cellular Immunology* 184, 85–91.
- 77) **Majumder, B., Biswas, R., Chattopadhyay, U., 2002.** Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. *International Journal of Cancer* 97, 493–500.
- 78) **Gómez-Ochoa P, Castillo J A, Gascón M, Zarate J J, Alvarez F, Couto C G 2002** Domperidone Against Leishmaniasis: Preliminary Results from First Therapeutic Trial Proceeding 27° Congresso WSAVA
- 79) **Gómez-Ochoa P, Castillo J A, Gascón M, Zarate J J et al.;** Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J* (2009) 259-263
- 80) **J. Llinás, P Gómez-Ochoa, D Sabaté, J Homedes, L Ferrer** Clinical efficacy of a Domperidone-based treatment program for the prevention of canine leishmaniasis. 01/2011; In proceeding of: SEVC-46th AVEPA Congress, At Barcelona)