

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CLINICHE VETERINARIE**

Ciclo XXIV

07/H4 CLINICA MEDICA E FARMACOLOGIA VETERINARIA

VET/08 CLINICA MEDICA VETERINARIA

TITOLO TESI

**Valutazione clinica, clinicopatologica e quantificazione di IgG e
IgM in corso di leishmaniosi canina:
studio retrospettivo**

Presentata da: Dott.ssa Elisa Garbatini

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Paolo Famigli Bergamini

Dott. Francesco Dondi

INDICE

INTRODUZIONE.....	4
Capitolo 1.....	6
Eziologia ed Epidemiologia.....	6
1.1 Eziologia della leishmaniosi.....	6
1.2 Distribuzione ed Epidemiologia.....	7
Capitolo 2.....	10
Patogenesi.....	10
2.1 Meccanismo patogenetico dell'infestazione.....	10
2.2 Progressione dell'infezione e risposta immunitaria sistemica.....	11
2.2.1 Immunità cellulo-mediata e ruolo delle citochine.....	13
2.2.2 Immunità umorale: immunoglobuline.....	14
2.3 Carica parassitaria ed immunità organo-specifica.....	16
2.4 Patogenesi del danno d'organo.....	17
Capitolo 3.....	20
Aspetti Clinici e Clinicopatologici della Leishmaniosi canina.....	20
3.1 Segnalamento e anamnesi.....	20
3.2 Riscontri clinici.....	20
3.2.1 Manifestazioni generali.....	21
3.2.2 Nefropatia in corso di leishmaniosi.....	24
3.3 Riscontri clinico-patologici.....	25
3.3.1. Valutazione della Protidemia e profilo elettroforetico.....	26
3.3.2. Le proteine di fase acuta.....	28
3.3.3 Coagulazione.....	29
Capitolo 4.....	30
Diagnosi di Leishmaniosi nel cane.....	30
4.1. Metodi diagnostici diretti.....	30
4.1.1 Citologia ed istologia.....	30
4.1.2 Metodiche molecolari.....	32
4.2 Metodi diagnostici indiretti.....	33
4.2.1 Immunomigrazione rapida.....	33
4.2.2 Test Elisa.....	33
4.2.3 Test di immunofluorescenza indiretta (IFI).	33
Capitolo 5.....	35

Stadiazione, Trattamento, Profilassi	35
5.1 Stadiazione del paziente.....	35
5.2 Farmaci utilizzati nella terapia della LCan	36
5.3 Indicazioni per il trattamento	37
5.4 Monitoraggio del trattamento.....	38
5.5 Cenni di Profilassi.....	39
5.5.1 Profilassi diretta	39
5.5.2 Profilassi Indiretta	40
CAPITOLO 6.....	42
SEZIONE SPERIMENTALE	42
1.Obiettivi	42
2.Materiali e metodi	43
2.1.Criteri d’inclusione e selezione dei pazienti	43
2.2.Determinazioni:.....	45
2.3. Analisi statistica	67
3.Risultati	68
3.1. Pazienti selezionati.....	68
3.2. Risultati di età, sesso, razza	69
3.3.Risultati dei segni clinici.....	71
3.4.Distribuzione dati clinico patologici	72
3.5. Risultati dei pazienti affetti da patologia renale (KD)	86
3.6.Risultati dei pazienti “anemici” e “non anemici”	93
3.7. Correlazioni.....	96
3.8 Risultati misurazioni Immunoglobuline G e Immunoglobuline M.....	97
4. Discussione	104
Bibliografia	110

INTRODUZIONE

La leishmaniosi canina causata da *Leishmania infantum* (sin. *Leishmania chagasi*) rappresenta un'importante zoonosi in molte aree del mondo e negli ultimi decenni, le aree considerate endemiche si stanno diffondendo anche in territori in cui la malattia prima era assente. L'infezione all'interno degli ospiti vertebrati può evolvere in differenti modi che dipendono essenzialmente dal tipo di risposta immunitaria che questi mettono in atto: animali che non sviluppano un'adeguata risposta immunitaria cellulo-mediata mostrano la sintomatologia clinica nonostante abbiano una forte ma inefficace risposta umorale mentre al contrario animali con un'efficiente risposta cellulo-mediata possono rimanere infetti per un lungo periodo di tempo senza manifestare segni di malattia o in alcuni casi possono eliminare definitivamente il parassita. La stimolazione antigenica in corso di leishmaniosi induce nei soggetti sensibili una forte risposta proliferativa policlonale da parte dei linfociti B con produzione di elevate quantità di γ -globuline responsabili assieme alla presenza diretta del parassita della sintomatologia clinica. La risposta anticorpale è composta sia da una componente specifica di anticorpi diretti verso i differenti epitopi parassitari sia da una componente aspecifica imputabile alla cronicizzazione del processo infiammatorio, alla reazione autoimmune che si instaura in corso di LCan ed anche ad una alterazione della capacità dei linfociti T di regolare la risposta immunitaria.

I sintomi clinici più comunemente riscontrati in corso di LCan sono: dimagrimento, anoressia, linfadenomegalia, alterazioni cutanee, manifestazioni oculari, zoppia, ed in caso di coinvolgimento renale si possono manifestare segni di patologia renale cronica secondari alla presenza di una glomerulonefrite causata dal deposito di immunocomplessi a livello glomerulare. Le manifestazioni della patologia renale cronica vanno dalla comparsa di poliuria/polidipsia fino agli stadi terminali di malattia renale cronica che frequentemente rappresenta la principale causa di morte nei soggetti affetti da leishmaniosi.

I farmaci utilizzati per il trattamento della leishmaniosi purtroppo nel cane, a differenza dell'uomo, consentono solo una riduzione della carica parassitaria e la remissione della sintomatologia (in molti casi) ma solo eccezionalmente la guarigione parassitologica. Questo comporta in alcuni soggetti la comparsa di recidive della malattia a distanza di mesi dopo il termine del trattamento.

La tesi che presentiamo si compone di una breve parte compilativa mirata a descrivere l'eziologia, l'epidemiologia di tale malattia ed in maniera più approfondita la patogenesi ed i segni clinici e clinicopatologici ad essa associati. Negli ultimi due capitoli sono, inoltre, accennate le metodiche diagnostiche ed i protocolli terapeutici disponibili.

La parte sperimentale della tesi si compone di una parte in cui sono state valutate da un punto di vista descrittivo il segnalamento, i segni clinici e clinicopatologici dei pazienti affetti da leishmaniosi portati in visita presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie con particolare attenzione sull'impatto della patologia renale e dell'anemia nel quadro clinico della LCan.

Successivamente, utilizzando una metodica immunoturbidimetrica per la misurazione di IgG ed IgM utilizzata nell'uomo e recentemente validata dal nostro laboratorio nel cane, sono state misurate le concentrazioni di tali immunoglobuline in corso di follow-up in alcuni dei soggetti inclusi nello studio e sottoposti a differenti trattamenti anti-*leishmania* al fine di indagare e meglio comprendere l'evoluzione della malattia in corso di trattamento e per poter stabilire, in maniera preliminare, se i titoli anticorpali aspecifici possano essere considerati dei biomarker per il monitoraggio della malattia.

Capitolo 1

Eziologia ed Epidemiologia

1.1 Eziologia della leishmaniosi

Le leishmaniosi sono un gruppo di malattie parassitarie causate da protozoi emoflagellati appartenenti al genere *Leishmania* che interessano in molte aree del mondo sia l'uomo che gli animali (domestici e selvatici) (Baneth, 2006).

I parassiti del genere *Leishmania* sono organismi bifasici che completano il loro ciclo biologico fra due ospiti: un'ospite invertebrato (flebotomo vettore) ed un'ospite vertebrato (mammiferi) che svolge il ruolo di reservoir della malattia. La forma flagellata (promastigote) è lunga circa 10-15 μm e si riscontra nell'insetto vettore, la forma non flagellata (amastigote) di dimensioni comprese tra 1,5 e 4 μm si riscontra invece negli ospiti vertebrati (Pampiglione, 1999).

Sono state identificate almeno 17 specie e sottospecie di *Leishmania* la cui classificazione si basa principalmente sulla comparazione di sequenze di DNA, analisi elettroforetica di isoenzimi (zimodemi), e reattività verso anticorpi monoclonali specie specifici (Alvar et al., 2004).

In medicina umana l'infezione da *Leishmania* può evolvere in diverse forme cliniche in funzione sia delle diverse specie di *Leishmania* coinvolte, sia dell'efficienza del sistema immunitario dell'individuo. Le tre forme cliniche principali nell'uomo sono quella cutanea (CL), muco-cutanea (MCL) e la forma più grave che è la viscerale (VL). Le leishmanie responsabili della forma viscerale sono: *L. donovani* presente in Africa, *L. infantum* in Asia, bacino del Mediterraneo inclusa l'Italia e *L. chagasi* in America Centrale (Ciaramella e Corona, 2003). La maggior parte delle specie di *Leishmania spp.* che infettano l'uomo presentano caratteristiche zoonotiche e solo poche sono strettamente antroponotiche (Baneth, 2006).

In medicina veterinaria l'importanza della malattia è legata principalmente alla capacità degli animali infetti, ed in modo particolare del cane, di fungere da serbatoio di infezione per leishmaniosi nelle aree in cui la malattia è endemica. Numerose specie di *Leishmania* possono infettare il cane ma le forme più importanti sono quelle sostenute da *L. infantum* nel Vecchio Mondo e dal suo sinonimo *L. chagasi* in Centro e Sud America poiché per queste il cane rappresenta il principale reservoir del parassita per l'uomo (Solano-Gallego et al., 2009).

La leishmaniosi canina causata da *L. infantum* (LCan) è classificata come VL, poiché è correlata ad alcune delle specie di *Leishmania* responsabili nell'uomo di VL, anche se nel cane si ha

generalmente un interessamento sia viscerale che cutaneo (Baneth, 2006). Le specie di *Leishmania* che infettano il cane e la loro distribuzione geografica è elencata nella **Tabella 1**.

Specie di Leishmania	Distribuzione geografica	Malattia clinica (uomo)
<i>L. infantum</i> ^a	Bacino mediterraneo, Asia, Iran, Armenia, Afghanistan, Cina	Viscerale
<i>L. donovani</i>	Est Africa	Viscerale
<i>L. tropica</i> ^b	Nord Africa	Viscerale
<i>L. chagasi</i> ^a	Centro e Sud America	Viscerale
<i>L. brasiliensis</i>	Centro e Sud America	Muco- cutanea
<i>L. paranensis</i>	Centro America	Muco- cutanea
<i>L. peruviana</i>	Ande Peruviane	Cutanea

Tab. 1: a) Principale agente eziologico della leishmaniosi viscerale nel cane;
b) Causa raramente leishmaniosi nel cane (Solano-Gallego et al., 2009 modificato)

1.2 Distribuzione ed Epidemiologia

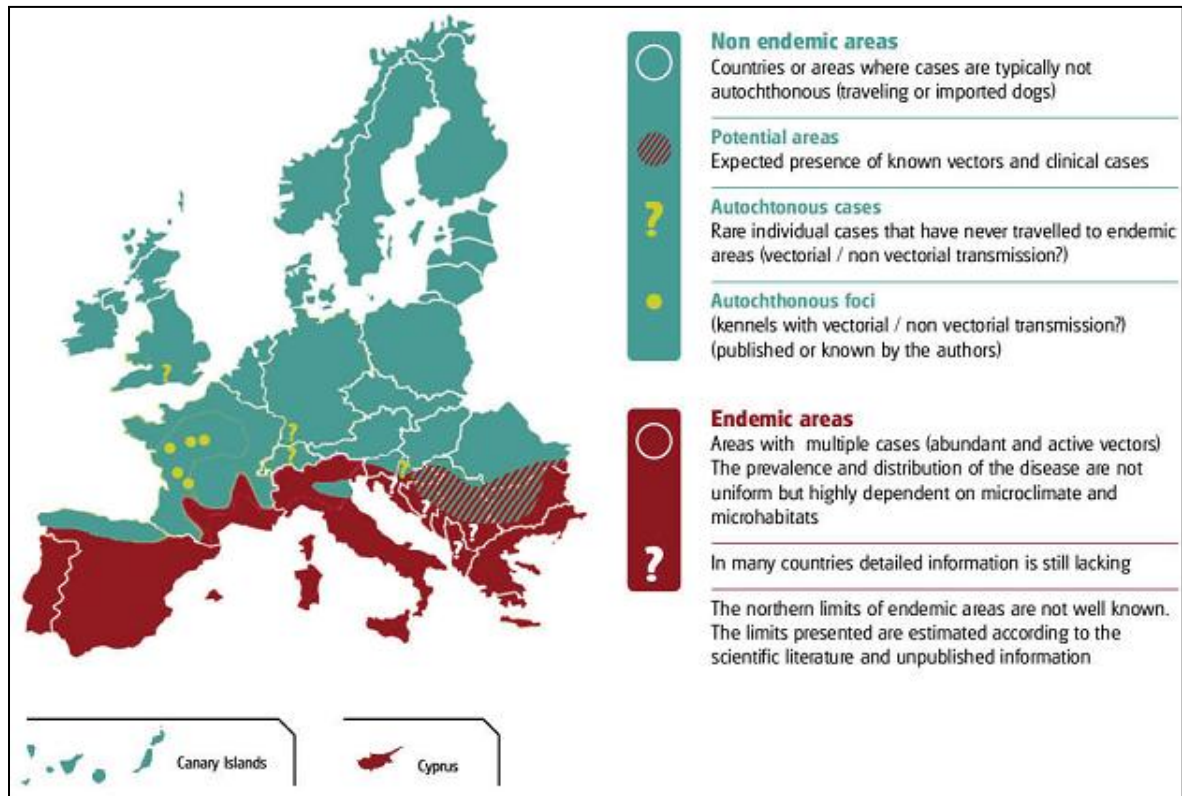
La leishmaniosi umana è una malattia endemica in 88 paesi (66 nel Vecchio Mondo e 22 nel Nuovo Mondo) e rappresenta per l'uomo la più importante malattia trasmessa da vettore dopo la malaria e la filariosi linfatica contando un'incidenza di 2 milioni di nuovi casi all'anno. Circa 50 sono invece i paesi tra l'Europa (tra cui anche l'Italia), l'Africa, l'Asia e l'America in cui è endemica la leishmaniosi nel cane e almeno 2,5 milioni sono i cani infetti nel solo sud-est Europa (Desieux, 2004). La distribuzione geografica delle aree endemiche corrisponde all'area di sviluppo dell'insetto vettore poiché questo è il solo artropode adattato naturalmente alla trasmissione biologica della *Leishmania*. I principali insetti vettori della *Leishmania* appartengono al genere *Phlebotomus spp.* nel Vecchio Mondo e *Lutzomya spp.* nel Nuovo Mondo. I flebotomi sono presenti principalmente nelle zone tropicali (America Latina) dove sono attivi anche per tutto l'anno e nelle zone a clima temperato (Asia e Bacino Mediterraneo), durante la stagione calda (Solano-Gallego et al., 2009). Occasionalmente sono state dimostrate modalità diverse di trasmissione del parassita rispetto a quella vettoriale: mediante trasfusioni di sangue da donatori portatori della malattia (de Freitas et al., 2006), trasmissione transplacentare (Rosypal et al., 2005) e venerea (Silva et al., 2009). Altre modalità supposte ma non ancora provate sono: trasmissione diretta da cane a cane

tramite morsicatura, che giustificherebbe la presenza di casi autoctoni di LCan in aree in cui non è stata identificata la presenza del flebotomo vettore, e mediante morso di altri artropodi ematofagi tra cui pulci (Coutinho e Linardi, 2007) e zecche (Ferreira et al., 2005; Dantas-Torres et al., 2011). Verosimilmente queste modalità di trasmissione giocano un ruolo marginale nell'epidemiologia della leishmaniosi canina; i casi di LCan diagnosticati nelle aree non endemiche riguardano infatti solitamente animali importati da aree endemiche o che vi hanno soggiornato durante la stagione della trasmissione (Baneth et al., 2008). La trasmissione della malattia in una nuova area può avvenire però solo se all'introduzione di animali infetti è associata la presenza di una popolazione di vettori permissivi abbastanza grande (Solano-Gallego et al., 2009).

La leishmaniosi è considerata oggi una malattia emergente o ri-emergente in molti paesi del bacino del Mediterraneo. Le condizioni climatiche (riscaldamento), le dinamiche socio-ecologiche (aumentata movimentazione di persone e animali) sono i fattori che hanno permesso la diffusione ed in alcuni casi la reintroduzione dei vettori e dei patogeni da essi trasmessi anche in aree in cui la malattia era assente (Otranto et al., 2009). Diversi gruppi di lavoro negli ultimi anni stanno eseguendo attività di sorveglianza (raccolta dati, esami di laboratorio, indagini entomologiche) al fine di monitorare e studiare la diffusione della leishmaniosi canina. I dati raccolti in Italia confermano che a partire dal 2002 il numero di casi autoctoni riscontrati sono passati da un 50% ad un 85% includendo in quest'ultima percentuale anche il Trentino Alto Adige e la Lombardia (zone considerate non endemiche fino a venti anni fa) ed in tutte le aree sottosorveglianza è stata trovata la presenza del vettore *P. perniciosus* (Maroli et al., 2008).

Monitoraggi sierologici e molecolari (PCR) in aree endemiche per leishmaniosi canina hanno evidenziato una di prevalenza d'infezione all'interno della popolazione canina molto elevata (63%-80%) tuttavia, questo dato non è accompagnato da altrettanto elevate percentuali di malattia clinica: solo il 13% circa dei soggetti infetti sviluppa la LCan. Studi longitudinali in aree endemiche hanno dimostrato che l'evoluzione naturale della malattia nei cani infetti può evolvere in differenti modi che dipendono essenzialmente dal tipo di risposta immunitaria che l'ospite (in questo caso il cane) mette in atto nei confronti dell'infezione. Animali che non sviluppano un'adeguata risposta immunitaria cellulo-mediata mostrano la sintomatologia clinica nonostante abbiano una forte ma inefficace risposta umorale mentre al contrario animali con un'efficiente risposta cellulo-mediata possono rimanere infetti per un lungo periodo di tempo (anche tutta la vita) senza manifestare segni di malattia o in alcuni casi possono eliminare definitivamente il parassita (Baneth et al., 2008). Nei soggetti infetti asintomatici la carica parassitaria cutanea, responsabile della trasmissione della malattia a vettori non infetti, è inferiore rispetto a quella riscontrata nei soggetti sensibili che hanno

sviluppato la malattia pertanto anche l'importanza epidemiologica dei cani infetti è probabilmente correlata alla suscettibilità alla LCan (Saridomichelakis, 2009).



*Fig. 1: Distribuzione dell'infezione da LCan in Europa
(Solano-Gallego et al., 2009)*

Capitolo 2

Patogenesi

2.1 Meccanismo patogenetico dell'infestazione

La *leishmania* è inoculata nella cute dell'ospite vertebrato sottoforma di promastigote durante il pasto di sangue del flebotomo femmina ematofago infetto. Dopo l'inoculo il parassita per riuscire a sopravvivere deve superare i meccanismi di difesa aspecifici messi in atto dall'ospite: la lisi mediata dal complemento e la produzione di metaboliti tossici all'interno dei macrofagi. Queste fasi iniziali in cui entra in gioco la risposta immunitaria innata sono fondamentali nel condizionare la progressione dell'infezione. Se il parassita riesce ad evadere questi sistemi di difesa e a sopravvivere moltiplicandosi all'interno del macrofago sottoforma di amastigote, conseguirà la lisi del macrofago stesso e la disseminazione del parassita in sedi distanti dal punto di inoculo. Nei soggetti suscettibili il parassita, veicolato dai macrofagi e da altre cellule del sistema reticolo endoteliale, si diffonde in tutto l'organismo a partire dagli organi linfoidi per cui ha particolare tropismo, mentre nei soggetti resistenti l'infezione rimane localizzata nella cute e nei linfonodi regionali (Alvar et al., 2004).

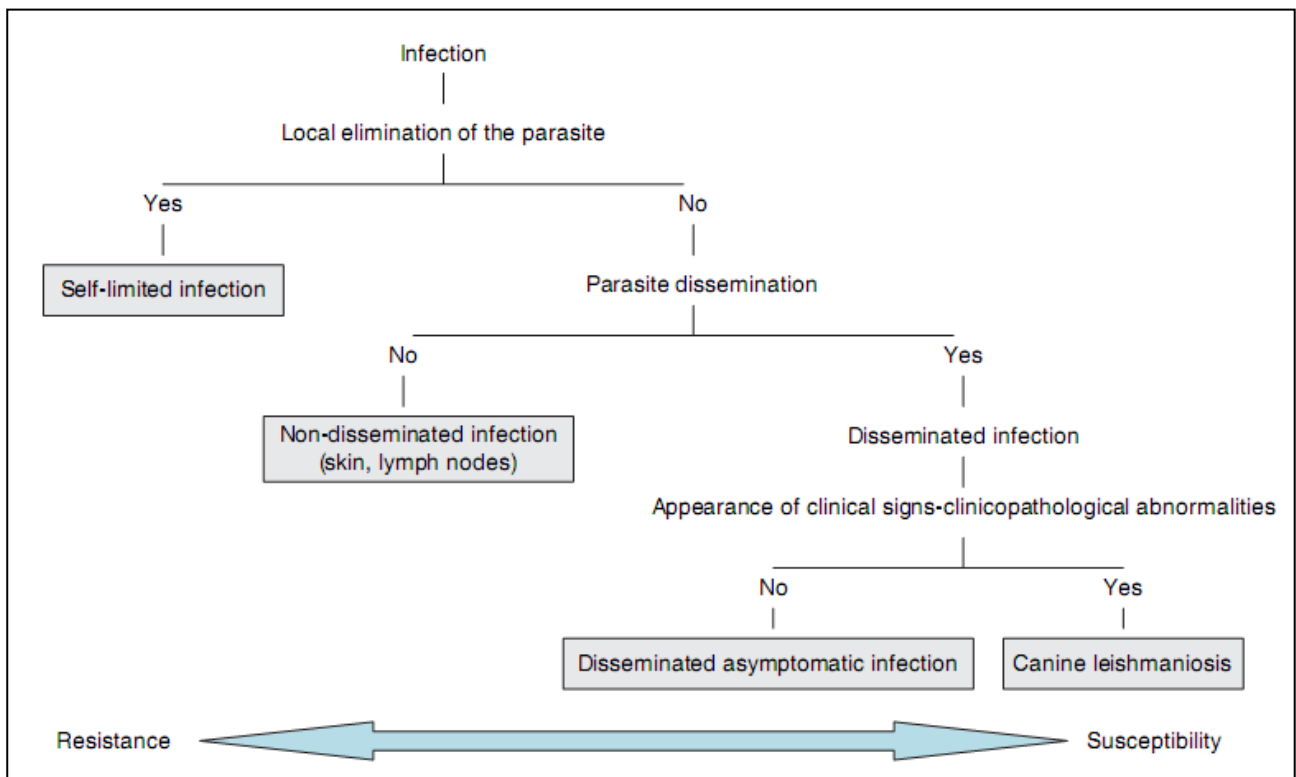


Fig. 2: Possibile evoluzione dell'infezione da *Leishmania infantum* nel cane

(Saridomichelakis, 2009)

2.2 Progressione dell'infezione e risposta immunitaria sistemica

L'evoluzione dell'infezione all'interno di un ospite è risultato dell'interazione tra il flebotomo vettore (ripetuti morsi infetti, reazione intradermica alla saliva del flebotomo), il parassita (virulenza) e l'ospite (patrimonio genetico, risposta immunitaria, patologie concomitanti) (Saridomichelakis, 2009). Nella maggior parte dei cani infetti l'infezione assume un andamento cronico e solo in una minoranza di casi evolve in malattia (LCan). Numerosi studi effettuati sia nell'uomo che sui topi e nel cane hanno dimostrato come il tipo di risposta immunitaria che l'animale sviluppa, condizionata sia da fattori genetici che non genetici, è determinante affinché un soggetto si mantenga infetto asintomatico (resistente) oppure che sviluppi la sintomatologia (sensibile) (Baneth, 2006; Alvar et al., 2004). In questa direzione sono stati effettuati numerosi studi per comprendere quali meccanismi determinino lo sviluppo di un'immunità protettiva nei confronti della *Leishmania* piuttosto che la progressione della malattia al fine sia di individuare indicatori immunologici per la progressione della malattia, che di permettere lo sviluppo di strategie mirate alla formulazione di vaccini e terapie contro la leishmaniosi. Un ruolo chiave nella protezione immunitaria è ormai comprovato essere mediato da una risposta dell'ospite di tipo prevalentemente cellulo-mediata con maggiore espressione di citochine derivate dai linfociti Th1 e CD4+. Nei cani malati al contrario vi è una risposta di tipo prevalentemente umorale Th2 dipendente, contraddistinta da un'elevata produzione di immunoglobuline (Ig) (G.S.L.C. 2007). La risposta da parte delle Ig è solitamente imponente ma non è protettiva e, a lungo termine, può aggravare la progressione della malattia a causa della formazione di immunocomplessi ed autoanticorpi (Baneth, 2006).

Alla luce di quanto osservato in studi effettuati sia *in vivo* che *in vitro*, oggi è diffusamente accettata la teoria che i macrofagi svolgono un ruolo centrale nel controllo dell'infezione e che citochine come l'interferone γ (IFN- γ), il *tumor necrosis factor* α (TNF- α) e l'IL-2 secreti in seguito all'attivazione dei linfociti Th1 ne stimolino l'attività leishmanicida. Studi *in vitro* hanno dimostrato come anche nel cane la produzione di ossido nitrico, che si è dimostrata una delle principali molecole ad attività leishmanicida prodotte dai macrofagi, è incrementata se la cellula è stimolata dall'IFN- γ (Sisto et al, 2001).

Sia la predisposizione sia la resistenza alla leishmaniosi canina, analogamente a quanto accade nell'uomo, sembra inoltre avere una base genetica. Ricerche nella leishmaniosi viscerale dell'uomo hanno individuato diversi geni implicati nella suscettibilità alla malattia, tra questi è stato riconosciuto il gene *Nramp-1* (Natural Resistent Associated Protein 1) che codifica per un catione implicato nell'up-regulation della produzione di citochine, tra cui il TNF, l'interleuchina -1b (IL-1b)

e della sintesi dell'ossido nitrico. Anche nel cane è stato dimostrato un polimorfismo di questo gene nei cani suscettibili alla malattia (Atlet, 2002). Studi comparativi sui livelli di espressione di questo gene tra gruppi di cani resistenti e di cani sensibili hanno dimostrato che in quest'ultimo i livelli erano aumentati tuttavia, la differenza tra i due gruppi non è risultata statisticamente significativa (Bueno et al., 2009). La possibilità che fattori genetici giochino un ruolo importante nella progressione dell'infezione è suggerita anche dal fatto che in alcune razze tra cui l'Ibizian hound, razza tipica delle Isole Baleari, i soggetti infetti sviluppano una risposta prevalentemente di tipo cellulo-mediata, quindi, "protettiva" nei confronti della progressione dell'infezione (Barbieri, 2006).

In ogni caso anche nei cani in cui si è sviluppata un'efficiente risposta cellulo-mediata e l'infezione ha assunto un decorso sub-clinico alcuni fattori quali l'immunodepressione e la presenza di patologie concomitanti possono rompere l'equilibrio del sistema immunitario e portare allo sviluppo della malattia clinica, analogamente a quanto verificato nell'uomo nei pazienti con coinfezione da immunodeficienza umana (HIV positivi) (Solano-Gallego et al., 2009; Alvar et al., 2008). Numerose patologie sono frequentemente riscontrate nella pratica clinica concomitantemente alla leishmaniosi influenzandone le manifestazioni clinico-patologiche e rendendo a volte più difficile l'interpretazione del quadro clinico del soggetto. Tra queste vi sono sia malattie infettive e parassitose (ehrlichiosi monolitica, babesiosi, anaplasmosi, bartonellosi, hepatozoonosi, dirofilariosi, demodicosi), malattie immuno-mediate (pemfigo foliaceo), endocrinopatie (ipotiroidismo), e varie neoplasie (emangiosarcoma, linfoma, mieloma, istiocitoma). La leishmaniosi è una delle malattie maggiormente diagnosticate nella pratica clinica pertanto è giustificabile la coesistenza di molte altre patologie assieme ad essa. Ciò nonostante, la frequenza di alcune comorbidità o la frequenza di positività per alcune malattie infettive sono superiori nei cani con LCan rispetto a quella che hanno da sole soprattutto nei soggetti anziani (Saridomichelakis, 2009). Per le malattie trasmesse da vettore questo in parte è giustificato dal fatto che spesso queste risultano endemiche nelle stesse aree in cui è presente la *leishmania*, ed in parte potrebbe essere spiegato dalla capacità della *Leishmania* di indurre una depressione della risposta cellulo-mediata dell'ospite rendendo quindi i soggetti colpiti più suscettibili allo sviluppo di altre patologie infettive, come resta comunque la possibilità che avvenga l'inverso (Koutinas e Mylonakis, 2010).

Analogamente anche per quanto riguarda i processi neoplastici alcuni autori suggeriscono la possibilità che possa esserci un relazione tra la leishmaniosi e lo sviluppo e la progressione tumorale (Ciaramella et al., 1997).

2.2.1 Immunità cellulo-mediata e ruolo delle citochine

Nel cane come anche nell'uomo l'immunità protettiva nei confronti della *Leishmania* è stata associata ad una forte risposta linfoproliferativa sistemica mediata dai linfociti Th1 che attraverso la produzione di IFN- γ , IL-2 e TNF- α ., come già descritto, stimolano l'attività leishmanicida dei macrofagi limitando la disseminazione del parassita. Un ruolo nella resistenza allo sviluppo della leishmaniosi è stato attribuito anche ai linfociti CD4+ e più recentemente anche ai CD8+: questa categoria di linfociti risulta infatti essere più rappresentata nei soggetti infetti asintomatici (soggetti che non manifestano la malattia) e oligosintomatici (soggetti che presentano qualche segno clinico) rispetto ai soggetti che hanno sviluppato la malattia (Alvar et al., 2004; Reis et al., 2009; Boggiatto et al. 2010). L'evoluzione invece di gravi forme di VL sia nel cane che anche nell'uomo è correlata all'inibizione della risposta Th1 dipendente anche se in questi pazienti non è stata dimostrata una netta dicotomia tra le risposte Th1/Th2. Una costante documentata invece in più studi sperimentali tra i soggetti malati è la scarsa espressione di IFN- γ , a cui però non si accompagna uno specifico pattern di citochine associate alla malattia. I ridotti livelli di IFN- γ secondo alcuni autori sono da attribuire ad una ridotta risposta dei linfociti CD4+ ed in generale allo stato di immunodepressione (Moreno et al. 1999). Per quanto riguarda le citochine Th2-dipendenti (IL-10 e IL-4), nell'uomo è da tempo riconosciuto che le concentrazioni sieriche di IL-10 sono correlate positivamente con lo stato clinico del paziente mentre nel cane non sono state riscontrate differenze significative tra soggetti sintomatici, oligosintomatici e asintomatici. Tuttavia, numerosi autori concordano nell'attribuire a questa citochina assieme al *transforming growth factor* β (TGF- β) un ruolo immunoregolatore correlato alla capacità di inibire la risposta delle cellule T favorendo pertanto la progressione della malattia (Vouldoukie et al., 1997; Gantt et al., 2003). Prendendo in considerazione l'IL-4, alcuni studi hanno evidenziato un suo coinvolgimento nella leishmaniosi cutanea ma non è stato ancora chiarito il suo ruolo (Carrillo e Moreno, 2009).

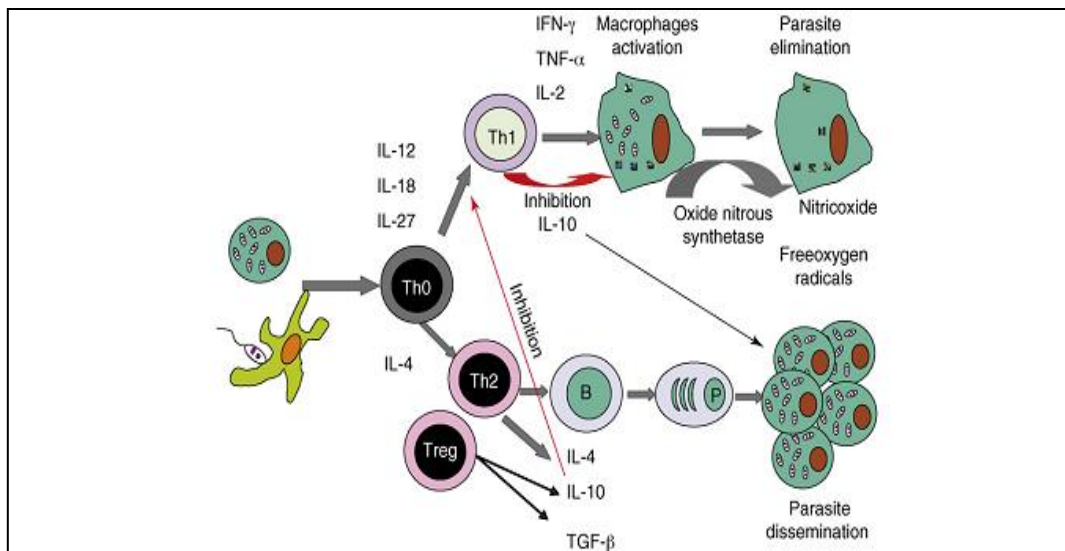


Fig. 3: Rappresentazione della complessa interazione tra la risposta Th1 e Th2 nella LCan (Baneth, 2008 modificato).

2.2.2 Immunità umorale: immunoglobuline

Nonostante sia chiara l'importanza della risposta protettiva cellulo-mediata Th1 dipendente, la leishmaniosi è associata anche allo sviluppo di una concomitante risposta immunitaria umorale che differisce significativamente tra soggetti sensibili e resistenti all'infezione (Day, 2007). La stimolazione antigenica in corso di leishmaniosi induce nei soggetti sensibili una forte risposta proliferativa policlonale da parte dei linfociti B con produzione di elevate quantità di γ -globuline ed in modo particolare di IgG (Font et al., 1994). La produzione anticorpale è composta da una componente specifica di anticorpi diretti contro i differenti antigeni parassitari, e da una componente aspecifica imputabile alla cronicizzazione del processo infiammatorio, alla produzione di anticorpi diretti contro i tessuti danneggiati dalla presenza del parassita e quindi alla reazione autoimmune che si instaura in corso di LCan ed anche ad una alterazione della capacità dei linfociti T di regolare la risposta immunitaria (Turrel et al., 1982; Ceci et al., 1989). Modelli di malattia indotta sperimentalmente hanno mostrato che la stimolazione proliferativa policlonale inizia a partire da un mese dopo l'inoculo del patogeno e a partire dal secondo/terzo mese compaiono gli anticorpi specifici anti-*leishmania* che persistono per lunghi periodi anche quando l'infezione è latente (Martinez-Moreno et al., 1993). La comparsa di anticorpi specifici avviene quindi generalmente prima che ci sia la manifestazione della malattia e, come sostengono molti autori, l'entità dell'incremento degli stessi è correlata positivamente con la progressione e la gravità dei segni clinici (Reis et al., 2006) Altri autori invece, non hanno riscontrato correlazioni tra la gravità delle manifestazioni cliniche ed i valori dei titoli anticorpali (Ferrer et al., 1995). Nei soggetti resistenti invece, vi è comunque una risposta umorale con produzione di tutte le classi di

immunoglobuline ma con frequenze e concentrazioni inferiori rispetto ai soggetti sensibili (Saridomikelachis, 2009).

Nel cane, analogamente a quanto fatto in medicina umana, sono state misurate in numerosi lavori sia la cinetica che la distribuzione delle diverse classi e sottoclassi di immunoglobuline specifiche anti-*leishmania* prodotte, sia in corso di infezione sperimentale che naturale, con risultati ancora oggi controversi. In alcuni lavori l'aumento delle IgG2 è stato trovato in cani asintomatici, mentre elevate concentrazioni di IgG1 sono state correlate allo sviluppo della malattia (Deplazes et al., 1994). In altri è stato valutato un pattern di IgG1 simile in asintomatici e sintomatici, con IgG2 elevate invece solo nei cani sintomatici (Leandro et al., 2001). La discrepanza tra i risultati ottenuti secondo Day è riconducibile all'impiego di antisieri policlonali (anziché monoclonali) per distinguere le varie classi di IgG specifiche anti-*leishmania*, metodica che invece non è sub-classe specifica (Day, 2007). Lavori recenti concordano nell'affermare che non esiste una sottoclasse di IgG specifiche maggiormente rappresentata in animali sintomatici piuttosto che in quelli asintomatici e che entrambe le sottoclassi risultano comunque più elevate nei cani sintomatici (Day, 2007; Bogiatto et al., 2010).

Per quanto riguarda le concentrazioni di IgM specifiche anti-*leishmania* dagli studi effettuati è emerso che le loro concentrazioni non differiscono significativamente tra gruppi di cani sani ed infetti, sia sintomatici che asintomatici (de Freitas et al., 2012; Reis et al., 2006b) tuttavia, confrontando i valori tra soggetti infetti asintomatici ed infetti sintomatici in quest'ultima popolazione i livelli di IgM erano significativamente più elevati. Gli autori avanzano pertanto l'ipotesi che negli animali malati le concentrazioni di IgM siano correlate positivamente con la progressione della malattia. Altro dato interessante riscontrato è che nonostante le IgM siano classicamente associate alle forme infettive acute, nella LCan i livelli di queste immunoglobuline, rilevate precocemente a partire da un mese post-infezione, persistono anche negli stadi cronici indipendentemente dallo stato clinico (de Freitas et al., 2012).

Per le IgA specifiche anti-*leishmania*, anche le loro concentrazioni aumentano con la progressione della malattia e questo come affermano diversi autori contribuisce al peggioramento dello stato clinico dell'animale (Iniesta et al., 2005; Reis et al., 2006b). Nello stesso studio è stato dimostrato inoltre che le concentrazioni di IgA sono correlate positivamente oltre che con lo stato clinico, anche con la carica parassitaria cutanea, splenica, epatica e del midollo osseo (Reis et al., 2006a).

Per quanto riguarda la produzione di IgE specifiche anti-*leishmania*, si è visto che le loro concentrazioni differiscono significativamente tra gruppi di animali infetti, sia malati che

asintomatici, rispetto ad un gruppo di soggetti sani tuttavia, non è stata trovata correlazione tra i titoli di IgE anti-*leishmania* e la presenza di sintomatologia clinica (de Freitas et al., 2012).

2.3 Carica parassitaria ed immunità organo-specifica

La risposta immunitaria sistemica non è la sola da valutare durante un infezione cronica, in quanto anche l'immunità sviluppata da parte dei singoli organi contribuisce a determinare lo stato clinico dell'animale. La risposta immunitaria organo specifica può essere prevalentemente di tipo Th1,Th2 oppure mista Th1/Th2 e studi recenti hanno dimostrato che esiste una buona correlazione tra quest'ultima e la carica parassitaria dell'organo (Maia e Campino, 2012). La valutazione della carica parassitaria viene stimata in "unità di *leishmania donovani*" (LDU) ovvero numero di amastigoti di *Leishmania* osservati ogni 1000 cellule nucleate (Stauber, 1995 modificato da Reis et al., 2006a). In ogni compartimento la carica parassitaria viene classificata come bassa (LP), media (MP) o elevata (HP). Tra gli organi esaminati la cute e la milza sono risultati quelli maggiormente parassitati nelle forme cliniche di LCan. Dallo stesso lavoro emerge inoltre che esistono delle buone correlazioni tra la carica parassitaria della milza e del midollo osseo e lo stato clinico del soggetto (Reis et al., 2006b).

A livello linfonodale le indagini svolte hanno messo in evidenza che l'aumento dei linfociti CD4+ può favorire il controllo dell'infezione mentre l'aumento dei linfociti CD8+ sembra essere associato alla persistenza del patogeno. Nei linfonodi di soggetti asintomatici l'INF- γ ed il TNF α si ritiene possano avere un ruolo protettivo contro l'infezione mentre nei soggetti sintomatici l'IL-10 e TGF β sembrano coinvolti nella progressione della malattia (Maia e Campino, 2012).

Studiando l'immunità locale a carico della milza, è stata verificata la partecipazione sia dei linfociti Th1 che Th2 tuttavia, non è stata trovata nessuna relazione tra le forme cliniche ed i livelli di IL-10, IL-4 (prodotte da linfociti Th2) e di TNF α , IL-12, INF γ (prodotte da linfociti Th1) espressi da parte degli splenociti (Lage et al., 2007). Confrontando invece le concentrazioni delle diverse interleuchine e citochine espresse dagli splenociti, con la carica parassitaria stimata dalle biopsie spleniche, diversi autori hanno riscontrato che i livelli di IL-10 erano superiori nei cani con elevata carica parassitaria (Lage et al., 2007). Per quanto riguarda l'immunità umorale, uno studio ha riscontrato una correlazione positiva tra la carica parassitaria della milza ed i livelli sierici di IgM specifici anti-*leishmania* (Reis et al. 2006a).

2.4 Patogenesi del danno d'organo

La disseminazione del parassita nella leishmaniosi viscerale canina è estesa alla maggior parte degli organi e tessuti dell'organismo. La presenza della *Leishmania* determina una reazione infiammatoria proliferativa con presenza di cellule infiammatorie (plasmacellule, istiociti e macrofagi) che ne causano una progressiva alterazione e disfunzione. Accanto al danno indotto direttamente dal parassita frequentemente si aggiunge quello correlato dalla presenza di immunocomplessi, secondari alla forte risposta umorale, composti principalmente da IgG e dalle frazioni C1, C2 e C4 del complemento (Makni et al., 1989).

Nei linfonodi e nella milza le regioni linfocitarie deputate alla produzione di linfociti T vengono distrutte a vantaggio delle regioni ricche di linfociti B, che proliferano e producono anticorpi. L'aumentata proliferazione dei linfociti B assieme alle plasmacellule, istiociti e macrofagi determina linfo-adenomegalia generalizzata, splenomegalia e persistente iperglobulinemia caratteristiche della leishmaniosi canina (Baneth, 2008).

Nel midollo osseo si riscontrano frequentemente quadri di mielodiplasia che possono manifestarsi con: anemia, leucopenia e piastrinopenia. Nel cane sono state rilevate soprattutto anemia e trombocitopenia. La mielodisplasia si ritiene possa essere una conseguenza della grande produzione di citochine da parte dei macrofagi presenti nel midollo. I macrofagi, oltre agli amastigoti, nel midollo osseo possono fagocitare anche gli eritroblasti (eritrofagocitosi). L'eritrofagocitosi si verifica raramente in condizioni fisiologiche e, generalmente, coinvolge solo le forme mature dei globuli rossi. In corso di malattia, invece, questa attività è molto importante e, secondo uno studio, è da attribuirsi, ancora una volta, ad una risposta anomala dei macrofagi nei confronti delle citochine prodotte dagli stessi macrofagi (TNF α e IFN γ) (Foglia Manzillo et al., 2006).

Nella LCan la cute, oltre a rivestire un'importante ruolo epidemiologico per la trasmissione del parassita a flebotomi non infetti, permettendo così il completamento del ciclo della *Leishmania*, rappresenta inoltre uno degli organi maggiormente interessati dal processo infettivo. La frequenza delle lesioni cutanee in corso di leishmaniosi è circa del 80-90% ma analizzando tramite biopsie la cute apparentemente sana di soggetti con LCan nella quasi totalità dei soggetti sono state riscontrate lesioni microscopicamente evidenti probabilmente come conseguenza della diffusione ematogena del parassita (Solano-Gallego et al., 2004). L'interessamento cutaneo nella LCan si manifesta con un'ampia varietà di lesioni imputabili sia a differenti meccanismi patogenetici (danno diretto indotto dal parassita, effetti secondari all'esagerata produzione di Ig sia a fattori genetici correlati alla razza (Fondati, 2010). Da un punto di vista istologico è possibile riscontrare a livello cutaneo quadri di infiammazione granulomatosa o piogranulomatosa a livello perivascolare, interstiziale e

periannessale che in alcuni casi coinvolgono anche il tessuto adiposo circostante (Saridomichelakis, 2009).

Nel cane, il coinvolgimento del fegato si manifesta con un'epatite cronica che frequentemente si presenta in maniera subclinica. A livello epatico è possibile trovare un infiltrato infiammatorio a carico dei sinusoidi, composto da plasmacellule, linfociti e macrofagi. Questi ultimi spesso contengono amastigoti intracellulari. Altre lesioni riscontrate nel fegato di soggetti infetti sono; iperplasia e ipertrofia delle cellule di Kupffer e fibrosi a livello portale (Rallis et al., 2005).

A carico dei muscoli si osservano delle forme di miosite che si manifestano con andamento cronico, esitando in atrofia muscolare. L'atrofia è più evidente nei muscoli masticatori piuttosto che in quelli scheletrici (Vamvakidis et al., 2000). Dal punto di vista patogenetico, la miopatia infiammatoria in corso di LCan è dovuta sia direttamente alla presenza del parassita nel tessuto che, indirettamente, alla presenza di anticorpi diretti contro le miofibre ed al deposito di immunocomplessi (Vamvakidis et al., 2000). Oltre ai meccanismi sopra elencati, l'atrofia può essere la conseguenza anche di un danno ischemico provocato dalla vasculite.

A carico dell'apparato scheletrico si riscontrano alcune forme di poliartrite e osteomielite in cui ancora una volta le lesioni sono attribuite sia al processo infiammatorio granulomatoso indotto dal parassita sia al meccanismo immuno-mediato con deposito di immunocomplessi a livello sinoviale (Agut et al., 2003). Secondariamente alla sinovite si può sviluppare osteolisi, probabilmente associata alla produzione di IL-1 che agisce sull'osso e sulla cartilagine, distruggendoli (Agut et al., 2003; de Souza et al., 2005).

Lesioni a carico del sistema cardiovascolare in corso di leishmaniosi sono descritte solo occasionalmente in letteratura e riguardano forme di miocarditi e pericarditi dovute ad una risposta infiammatoria indotta dalla presenza del parassita nel tessuto. Le alterazioni del miocardio, riportate in corso di leishmaniosi, di solito non portano ad un'insufficienza cardiaca, tranne in caso di pericardite (Font et al., 1993; Torrent et al., 2005).

La vasculite, causata da una reazione di ipersensibilità di III, tipo riveste un ruolo determinante nella leishmaniosi canina, provocando lesioni in molti organi (cute, intestino, linfonodi, milza, reni, vescica, cuore, polmone, surrenali, occhio, cervello). L'infiammazione a carico della parete dei vasi è responsabile di una poliarterite necrotizzante con ischemia ed emorragie negli organi coinvolti (Pumarola et al. 1991).

Tra gli organi coinvolti nella patologia, anche l'occhio è importante. I segni clinici riportati sono conseguenti sia alla presenza di infiltrati di plasmacellule e macrofagi contenenti amastigoti di *Leishmania* nelle diverse strutture oculari, sia al deposito di IgG e immunocomplessi che alterano la permeabilità vascolare (Garcia-Alonso et al., 1996; Pena et al., 2008). Le strutture coinvolte nel processo infettivo sono, in ordine di frequenza, la congiuntiva e il limbo, l'iride e il corpo ciliare. La congiuntiva, inoltre, è stata utilizzata in molti studi per identificare direttamente la *Leishmania* e grazie al grande numero di parassiti identificati con le metodiche dirette (PCR in particolare) si può considerare uno dei tessuti target per la diagnosi (Pena et al., 2008).

Nella leishmaniosi viscerale dell'uomo e del cane un altro importante organo coinvolto nella patogenesi è il rene. Nello studio di Costa et al. del 2003 in 55 cani con leishmaniosi viscerale, con o senza sintomatologia riferibile a nefropatia, tramite istologia sono stati evidenziati quadri di glomerulonefrite (100%) e di nefrite interstiziale (78,2%) dove nella maggior parte dei casi (90,9%) è stato possibile identificare (sia a livello glomerulare che interstiziale) la presenza dell'antigene *Leishmania* (Costa et al., 2003). La patogenesi del danno renale secondo la maggior parte degli autori è attribuita principalmente al deposito di immunocomplessi circolanti (ipersensibilità di III tipo). Questo si verifica prevalentemente nel glomerulo, ed in particolare a livello della membrana basale. Da un punto di vista istologico le lesioni glomerulari riscontrate corrispondono a quelle riportate nella LV umana e sono: glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite mesangiale e glomerulonefrite segmentale (Nieto et al., 1992; Koutinas et al., 1994; Zatelli et al., 2003). Nella maggior parte dei soggetti affetti da LCan le glomerulopatie determinano la comparsa di una persistente proteinuria non selettiva che coinvolgono secondariamente, danneggiandolo, il compartimento tubulo-interstiziale (Zatelli et al., 2003; Zatelli et al., 2010).

Secondo altri autori invece il danno renale ed in modo particolare la glomerulonefrite, non sono dovuti tanto alla presenza di depositi di immunoglobuline e complemento a livello glomerulare, che non risulterebbero maggiormente presenti nella popolazione di cani infetti rispetto a cani sani, quanto invece alla presenza di infiltrati infiammatori composti di linfociti T CD4 + richiamati dalla presenza dell'antigene *leishmania* (Costa et al., 2010).

Capitolo 3

Aspetti Clinici e Clinicopatologici della Leishmaniosi canina

3.1 Segnalamento e anamnesi

Tutte le razze sono considerate sensibili all'infezione da *Leishmania*, tuttavia alcune sembrano più predisposte a sviluppare la sintomatologia clinica, come ad esempio il Boxer, il Cocker Spaniel, il Rottweiler ed il Pastore Tedesco mentre in altre come l'IBizian hound e meticci provenienti da aree in cui la malattia è endemica mostrano una frequenza minore di malattia (Solano-Gallego et al., 2000; Saridomichelakis, 2009). Per quanto riguarda il sesso, secondo alcuni autori la malattia si sviluppa con la stessa frequenza in entrambe i sessi, mentre altri hanno riportato un maggior rischio nel sesso maschile analogamente a quanto osservato nei criceti (Solano-Gallego, 2009). Nonostante l'infezione sia trasmessa nelle aree endemiche a clima temperato durante stagione primaverile/estiva, la malattia non presenta un andamento stagionale. All'interno di una popolazione di cani malati la prevalenza della malattia sembra avere una distribuzione bimodale con un primo picco nei soggetti di età inferiore ai 3 anni, che comprende l'80% dei cani coinvolti e un secondo picco, meno significativo, tra gli 8 e i 10 anni di età (Abranches et al., 1991b; Cardoso et al., 2004). Nei casi in cui ci sia un sospetto clinico e/o laboratoristico di leishmaniosi è molto importante sapere se il cane vive o ha soggiornato in aree endemiche durante il periodo di trasmissione della malattia, se ha ricevuto trattamenti immunosoppressivi e se è stata effettuata una profilassi adeguata contro la puntura del flebotomo dal momento che questa rappresenta la principale modalità di diffusione della malattia (G.S.L.C., 2007).

3.2 Riscontri clinici

I sintomi clinici della LCan possono essere molto variabili come conseguenza sia dei numerosi meccanismi implicati nella patogenesi della malattia sia come risultato della differente risposta immunitaria che presentano gli ospiti (Baneth et al., 2008). Potenzialmente la malattia può coinvolgere qualsiasi organo o tessuto e le manifestazioni cliniche generali frequentemente si rivelano piuttosto aspecifiche rendendo più ampia la lista delle diagnosi differenziali.

Clinical manifestations	Laboratory abnormalities
General <ul style="list-style-type: none"> ◊ Generalized lymphadenomegaly ◊ Loss of body weight ◊ Decreased or increased appetite ◊ Lethargy ◊ Mucous membranes pallor ◊ Splenomegaly ◊ Polyuria and polydypsia ◊ Fever ◊ Vomiting ◊ Diarrhea (including chronic colitis) 	Serum proteins and electrophoretogram <ul style="list-style-type: none"> ◊ Hyperglobulinemia ◊ Polyclonal beta and/or gammaglobulinemia ◊ Hypoalbuminemia ◊ Decreased albumin/globulin ratio
Cutaneous <ul style="list-style-type: none"> ◊ Non-pruritic exfoliative dermatitis with or without alopecia ◊ Erosive-ulcerative dermatitis ◊ Nodular dermatitis ◊ Papular dermatitis ◊ Pustular dermatitis ◊ Onychogryphosis 	CBC/Hemostasis <ul style="list-style-type: none"> ◊ Mild to moderate non-regenerative anemia ◊ Leukocytosis or leukopenia ◊ Thrombocytopathy ◊ Thrombocytopenia ◊ Impaired secondary hemostasis and fibrinolysis
Ocular <ul style="list-style-type: none"> ◊ Blepharitis (exfoliative, ulcerative, or nodular) and conjunctivitis (nodular) ◊ Keratoconjunctivitis, either common or sicca ◊ Anterior uveitis/Endophthalmitis 	Biochemical profile/urinalysis <ul style="list-style-type: none"> ◊ Mild to severe proteinuria ◊ Renal azotemia ◊ Elevated liver enzyme activities
Other <ul style="list-style-type: none"> ◊ Mucocutaneous and mucosal ulcerative or nodular lesions (oral, genital and nasal) ◊ Epistaxis ◊ Lameness (erosive or non-erosive polyarthritis, osteomyelitis, polymyositis) ◊ Atrophic masticatory myositis ◊ Vascular disorders (systemic vasculitis, arterial thromboembolism) ◊ Neurological disorders 	

Tab. 3: *Manifestazioni cliniche ed alterazioni laboratoristiche riscontrate in corso di LCan*
(Solano-Gallego et al., 2011)

Vista l'ampia varietà di sintomi clinici e della loro insorgenza, nel corso degli anni alcuni autori hanno proposto dei criteri di classificazione per inquadrare meglio l'evoluzione della malattia. Una prima classificazione si basa sull'esordio dei segni clinici e prevede la suddivisione della malattia in: acuta, subacuta, cronica e latente (Lanotte et al., 1979). Un'altra classificazione si basa sulla capacità di manifestare i segni clinici, i pazienti vengono così suddivisi in sintomatici, oligosintomatici e asintomatici (Mancianti et al., 1988; Abranches et al., 1991b). Altri autori, infine, suddividono la malattia in tre periodi a seconda della sua progressione e della comparsa di segni più specifici di leishmaniosi (Alvar et al.2004). Attualmente il criterio di stadiazione più diffuso è quello proposto dal gruppo di studio sulla leishmaniosi canina (GSLC) che prevede un approccio integrato tra riscontri clinici, alterazioni laboratoristiche e riscontri diagnostici (G.S.L.C., 2007). La classificazione è riportata nel capitolo inerente al trattamento e stadiazione.

3.2.1 Manifestazioni generali

La perdita di peso, la debolezza, l'intolleranza all'esercizio e l'atrofia muscolare sono sintomi che accomunano il 60% dei cani malati assieme alla linfadenomegalia periferica (62-90%). L'aumento di volume dei linfonodi di può superare di 2-6 volte le dimensioni normali ed è di

solito generalizzato (Baneth, 2006). La linfadenomegalia si manifesta principalmente nelle fasi acute della malattia mentre negli stadi più avanzati, specialmente nei soggetti con coinvolgimento renale, i linfonodi possono essere ipoplastici come conseguenza dello scadente stato di nutrizione dell'animale (Koutinas et al., 1999). Alla palpazione dell'addome in alcuni soggetti è possibile riscontrare splenomegalia, nonostante generalmente questo segno sia più facilmente evidenziabile mediante l'ausilio di esami di diagnostica per immagini o all'esame post-mortem (Koutinas et al., 1999).

Le lesioni cutanee sono assieme alla linfadenomegalia una delle manifestazioni cliniche più comuni nella LCan (prevalenza dall'80 fino al 90%) e frequentemente rappresentano il motivo per cui vengono condotti a visita gli animali malati. Le manifestazioni cutanee sono molto variabili tra i soggetti colpiti e, questo, si ipotizza essere dovuto a fattori quali: razza, età, patrimonio genetico, presenza di malattie concomitanti, carica parassitaria e virulenza del ceppo di *Leishmania*. I quadri cutanei che si possono riscontrare sono comunemente suddivisi in tipici, che sono i più caratteristici, ed in atipici, meno comuni e probabilmente causati da altre malattie concomitanti (Fondati, 2010). Tra le alterazioni cutanee tipiche vi sono: la dermatite desquamativa, la dermatite ulcerativa e la dermatite papulare; le manifestazioni atipiche comprendono invece la dermatite nodulare, l'alopecia multifocale, la dermatite pustolosa, onicopatie, lesioni nasali simil lupus cutaneo ed ipercheratosi naso-congiuntivale (Fondati, 2010). Le lesioni cutanee sopraelencate possono essere aggravate dalla presenza di infezioni opportunistiche (piodermite, demodicosi) che intervengono secondariamente allo stato di immunodepressione che accomuna i soggetti malati (Baneth, 2006).

La presenza di lesioni a carico delle superfici mucose è un reperto raro nella leishmaniosi, tuttavia sulla lingua, pene, prepuzio e cavità orale sono state osservate delle lesioni nodulari simil tumorali (Font et al., 1996).

Circa il 20-40 % dei cani affetti da LCan presentano lesioni oculari, anche in questo caso i sintomi oculari possono manifestarsi o meno concomitantemente alla presenza di altri segni di malattia sistemica. Spesso le lesioni oculari si presentano con più di un segno clinico associato poiché quasi tutte le componenti oculari possono essere interessate direttamente o indirettamente dal processo infettivo (Pena 2000; Crotti, 2010). Le manifestazioni oculari più comuni sono la congiuntivite, la blefarite (esfoliativa, ulcerativa o nodulare), l'uveite anteriore e la cheratocongiuntivite (Koutinas et al., 1999).

Sintomi gastroenterici tra cui diarrea del piccolo o del grosso intestino sono stati segnalati con una prevalenza variabile dal 6 al 30%. Nella maggior parte dei casi è stato possibile ricondurre la sintomatologia alla presenza di un'insufficienza renale o epatica che possono svilupparsi nel corso della malattia. Meno frequentemente la sintomatologia è da ricondursi ad una forma di colite piogranulomatosa causata dalla presenza del parassita nella mucosa intestinale (Koutinas et al., 1999; Amadama-Moraitou et al., 2007)

L'epistassi è un sintomo riscontrato nel 5-10% dei soggetti sintomatici (Baneth et al., 2008). I principali fattori che ne determinano la comparsa sono la presenza di lesioni ulcerative infiammatorie sulla mucosa nasale e l'iperproteinemia. L'elevata concentrazione di γ -globuline può associarsi infatti all'aumento del numero di immunocloroplasti circolanti che depositandosi a livello endoteliale interferiscono sulla funzionalità piastrinica e quindi sull'emostasi primaria (Juttner et al., 2001). Un altro fattore che può predisporre all'insorgenza dell'epistassi è l'ipertensione, secondaria sia all'iperviscosità sia, nei soggetti in cui la leishmaniosi ha provocato una malattia renale cronica, alla nefropatia (Juttner et al., 2001).

Nel 20-40% dei cani con leishmaniosi possono comparire segni correlati alla presenza di problemi ortopedici che si manifestano con zoppia, dolore alla palpazione delle articolazioni, riluttanza al movimento ed atrofia muscolare (Amasategui et al., 2004; Sbrana et al., 2010). La sintomatologia dell'apparato muscolo scheletrico è causata principalmente dalla poliartrite, da osteopatie e meno frequentemente dalla polimiosite. In caso di poliartrite le articolazioni più colpite sono quelle del carpo, delle ginocchia e del garretto (Agut et al., 2003). A livello scheletrico le lesioni riscontrate più frequentemente sono state delle proliferazioni periostali ed intramidollari nelle diafisi delle ossa lunghe causate da una reazione infiammatoria granulomatosa nei confronti del parassita, ed osteolisi articolare dovuta principalmente al deposito di immunocomplessi a livello sinoviale.

La miosite in corso di leishmaniosi ha un andamento cronico subclinico, i sintomi di polimiosite si rendono evidenti attraverso rigonfiamenti muscolari associati a dolore alla palpazione, disturbi nella locomozione, intolleranza all'esercizio ed atrofia muscolare (Vamvakidis et al., 2000).

In due soggetti affetti da LCan è stato riscontrato un coinvolgimento del sistema nervoso centrale ma solo in uno di questi l'interessamento neurologico è stato associato alla presenza di sintomi che comprendevano: letargia, paresi, rigidità cervicale e del rachide. Nel cane che presentava questa sintomatologia nervosa, l'analisi istopatologica ha rilevato, a carico delle meningi un'infiammazione di tipo granulomatoso con presenza di linfociti, plasmacellule ed istiociti che contenevano organismi riferibili a *Leishmania* (Vinuelas et al., 2001).

3.2.2 Nefropatia in corso di leishmaniosi

Come già illustrato nel precedente capitolo, la LCan è una patologia associata ad un'elevata prevalenza di malattia renale cronica (CKD) sostenuta nella maggior parte dei casi da una glomerulonefrite associata ad una nefrite tubulo-interstiziale (Cortadellas et al., 2008). La nefropatia nella LCan può essere anche il solo riscontro clinico (Baneth et al., 2008). Il meccanismo fisiopatologico del danno renale in corso di leishmaniosi determina nella maggior parte dei cani la presenza di una proteinuria non selettiva di entità moderata che in una minoranza di soggetti può evolvere in sindrome nefrosica fino agli stadi terminali di malattia renale cronica (Zatelli et al., 2003). Nello studio di Cortadellas et al. su una popolazione di cani affetti da leishmaniosi tramite distick urinario è stata rilevata la presenza di proteinuria in 82/105 soggetti ma solo in 34/85 il rapporto proteine urinarie /creatinina urinaria (UP/C) era > 1 (Cortadellas et al., 2006). Nei cani leishmaniotici affetti da malattia renale cronica uno dei primi sintomi riportati all'anamnesi dai proprietari sono la poliuria/polidipsia, accompagnate nei casi più gravi da una progressiva perdita di peso e da disoressia. Nelle fasi avanzate di CKD i sintomi sono riferibili principalmente alla presenza di una sindrome uremica dovuta alla mancata eliminazione renale di metaboliti tossici. Nei soggetti proteinurici i segni clinici riscontrati dipendono dalla gravità della perdita proteica urinaria, molti animali sono asintomatici e la presenza di proteinuria viene rilevata attraverso uno screening del paziente mentre in una minoranza di casi gli animali sono condotti a visita per i sintomi correlati alla presenza di una sindrome nefrosica tipica delle nefropatie proteino-disperdenti come quella in corso di leishmaniosi (Pressler 2011).

Nonostante l'elevata prevalenza di CKD (100%) nei cani affetti da leishmaniosi, l'azotemia tipica dell'insufficienza renale è un dato laboratoristico riscontrato solo nel 30 -50% dei casi (Slappendel et al., 1988; Cortadellas et al., 2006;) questa discordanza di risultati è dovuta verosimilmente alla bassa sensibilità della creatinina plasmatica nel diagnosticare precocemente una riduzione della funzionalità renale. L'utilizzo di mezzi diagnostici più sensibili tra cui il GFR (*Glomerular filtration rate*) hanno dimostrato infatti che nei cani leishmaniotici sia azotemici che normoazotemici, la funzionalità renale è significativamente ridotta rispetto a soggetti sani (Cortadellas et al., 2008).

L'ipertensione è una complicazione riscontrata dal 60% all'80% dei cani con malattia renale di origine glomerulare e si sviluppa secondariamente al danno renale indipendentemente dalla presenza o meno di proteinuria che può a sua volta aggravare se non trattata (Vaden and Grauer, 2011). Percentuali analoghe di frequenza sono stati riscontrati. in un gruppo di cani affetti da leishmaniosi, in cui l'ipertensione è stata riscontrata più frequentemente nei cani proteinurici e/o

iperazotemici assieme ad una correlazione positiva tra l'ipertensione e l'albuminuria, i livelli di creatinina sierici ed il rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (Cortadellas et al., 2006).

La sopravvivenza dei cani leishmaniotici sottoposti a trattamento anti protozoiario è stata correlata alla gravità della patologia renale che rappresenta in questi soggetti la causa principale di morte, da qui l'importanza di indagare la funzionalità renale per stadiare e trattare, se presente, la nefropatia al fine di rallentarne la progressione (Costa et al., 2003; Solano-Gallego et al., 2009).

In accordo con la stadiazione IRIS (*International Renal Interest Society*) la CKD in corso di LCan può essere classificata in quattro stadi in base ai valori sierici di creatinina ed in ulteriori due sottostadi indipendenti in base alla presenza ed alla gravità di proteinuria ed ipertensione (IRIS, 2007)

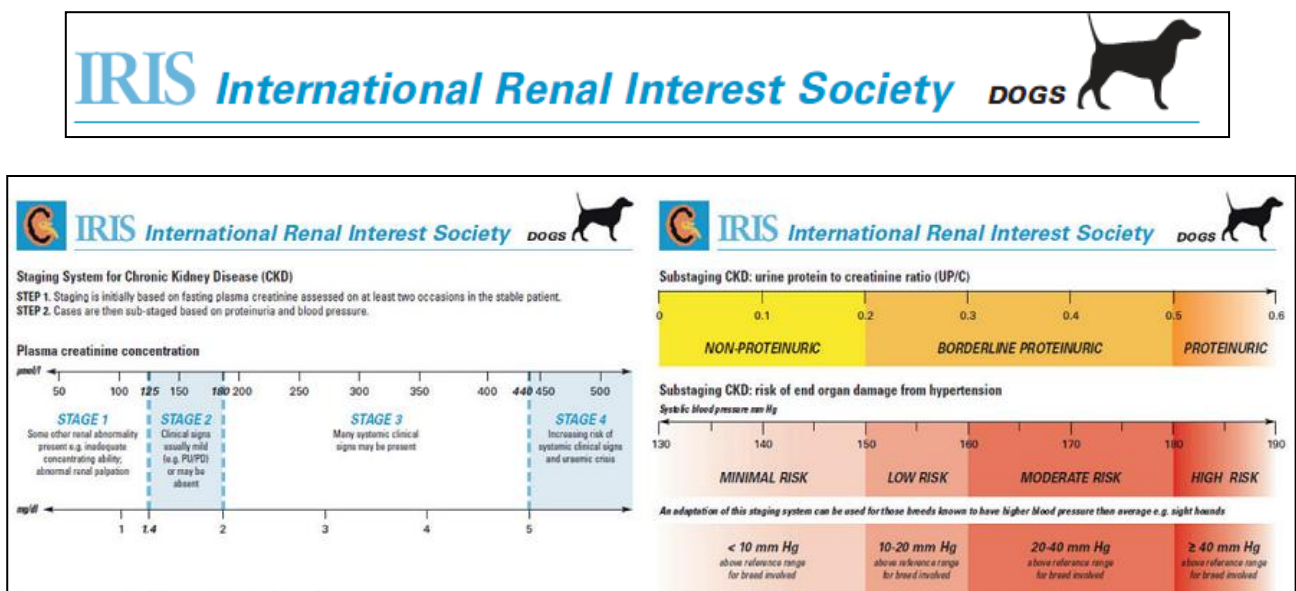


Fig. 4: Stadiazione della CKD (www.iris-kidney.com)

3.3 Riscontri clinico-patologici

Nel 60-73,4% dei soggetti leishmaniotici è stata riscontrata anemia normocromica, normocitica non rigenerativa (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999). Dal punto di vista clinico l'anemia si manifesta con pallore delle mucose, apatia, letargia, debolezza e anoressia (Polzin, 2011). La sindrome anemica nei cani con LCan può essere attribuita a numerosi meccanismi patogenetici tra cui una diminuita eritropoiesi dovuta allo stato infiammatorio cronico, oppure, all'insufficienza renale (Baneth et al., 2008). La riduzione dell'eritropoiesi nella leishmaniosi canina può essere aggravata anche dalla carenza di ferro che può seguire ad una

perdita cronica di sangue (per esempio, in caso di ulcerazioni cutanee, epistassi, patologia gastrointestinale) o al danno diretto a livello midollare che induce una displasia della linea eritroide (Foglia-Manzillo et al., 2006). Meno frequentemente l'anemia nei cani affetti da leishmaniosi può essere causata ad un processo emolitico immunomediato che può intervenire o in seguito alla produzione di autoanticorpi diretti contro gli antigeni eritrocitari, secondariamente al deposito di immunocomplessi sulla membrana dei globuli rossi, oppure per un'alterazione della membrana del globulo rosso causata dal parassita che ne riduce l'emivita per un maggior sequestro da parte della milza (Brandoniso et al., 1990; de Luna et al., 2000; Bilidik et al., 2004). L'anemia che si sviluppa per lisi degli eritrociti solitamente è di tipo rigenerativo, caratterizzata da un'adeguata risposta proliferativa da parte del midollo, ed è associata ad una variazione degli indici eritrocitari (Giger, 2005).

Generalmente il leucogramma nei cani affetti da leishmaniosi non subisce notevoli variazioni, tuttavia in una piccola percentuale di soggetti sono state riscontrate sia leucocitosi neutrofilica che leucopenia. La leucocitosi interessava principalmente soggetti con piodermite o sintomi gastroenterici correlati con la presenza di infezioni batteriche secondarie. Occasionalmente sono state segnalate monocitosi ed eosinofilia (Amusatogui et al., 2003). Quadri di leucopenia con riduzione degli eosinofili, dei monociti e dei linfociti sono stati riscontrati invece in soggetti con elevata carica parassitaria nel midollo osseo (Reis et al., 2006a)

Per quanto riguarda le piastrine le alterazioni rilevate più frequentemente in corso di leishmaniosi sono la trombocitopenia (riduzione del numero di piastrine) e le trombocitopatie (alterazioni della funzionalità piastrinica). Nella LCan queste manifestazioni sono dovute principalmente all'attivazione di meccanismi immuno-mediati secondari all'infezione da *leishmania* con produzione di anticorpi IgG e IgM anti-piastrine. In questo caso gli anticorpi anti-piastrine non solo alterano la funzionalità piastrinica ma compromettono altresì l'emostasi primaria (Cortese et al., 2009). Altre cause di trombocitopenia in corso di LCan sono: maggior permeabilità vasale in seguito a vasculite, splenomegalia con sequestro di piastrine, difetti della trombocitopoiesi midollare, aumentata distruzione piastrinica secondaria ad insufficienza renale o epatica (Ferrer 1992; Ciaramella et al., 2005).

3.3.1. Valutazione della Protidemia e profilo elettroforetico

La valutazione quantitativa del profilo protidemico viene normalmente eseguita mediante elettroforesi sierica che permette di distinguere le proteine plasmatiche in albumine e globuline che a loro volta vengono suddivise nelle diverse frazioni: α , β e γ . Le α e le β sono ulteriormente

suddivise in: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 . Albumine, α e β globuline sono sintetizzate a livello epatico mentre le γ globuline sono prodotte dai linfociti B o dalle plasmacellule e sono responsabili della risposta immunitaria di tipo umorale (Stockham, 2010).

Le albumine assieme a molte delle globuline α e β vengono definite proteine di fase acuta (APP), ovvero, proteine le cui concentrazioni sieriche o plasmatiche subiscono modificazioni in risposta ad uno stimolo infiammatorio di varia natura (infettivo, immunitario, traumatico, neoplastico, parassitario). L'albumina assieme alla transferrina (TIBC) è identificata come proteina di fase acuta "negativa" in quanto il fegato in seguito ad uno stimolo infiammatorio, ne riduce la produzione. Fibrinogeno, proteina C reattiva (CRP), amiloide A sierica, Aptoglobina, Ceruloplasmina, e α_1 glicoproteina acida sono invece proteine di fase acuta "positive" la cui produzione aumenta negli stati infiammatori (Thomas, 2000).

A partire dagli anni 80 lo studio e la caratterizzazione del profilo protidemico in corso di leishmaniosi è sempre stato oggetto di numerosi studi, l'attenzione è stata rivolta in modo particolare alle immunoglobuline ed al loro rapporto in relazione alla concentrazione di albumine. Questo perché la LCan è malattia infettiva contraddistinta da una stimolazione cronica del sistema immunitario con produzione di elevate quantità di immunoglobuline la cui importanza non è limitata al ruolo protettivo nel mediare la risposta umorale ma soprattutto esse giocano un ruolo determinante nella patogenesi e nella progressione della malattia.

Nei cani leishmaniotici è frequente pertanto il riscontro di una riduzione del normale rapporto albumine/globuline che è giustificato da un lato dall'aumentata produzione di globuline ed in modo particolare di γ -globuline, ed in misura minore di β -globuline, e dall'altro dalla concomitante presenza di ipoalbuminemia. L'ipoalbuminemia nella leishmaniosi canina può originare oltre che dallo stato infiammatorio, anche dall'epatopatia, dello scadente stato di nutrizione degli animali e nei soggetti con coinvolgimento renale dalla presenza di una nefropatia proteino-disperdente (Koutinas et al., 1999).

Nella leishmaniosi canina il tracciato elettroforetico può essere caratterizzato quindi dalla presenza di un picco nelle regioni delle β globuline, secondario allo stato infiammatorio indotto dal parassita relativo quindi alla risposta di fase acuta, e ad un picco nella regione delle γ globuline secondario invece alla forte risposta immunitaria umorale (gammopatia); spesso in corso di LCan i due picchi graficamente possono fondersi conferendo al tracciato elettroforetico un aspetto caratteristico (Ciaramella et al., 2003; Amasategui et al., 2003). La gammopatia in corso di leishmaniosi è tipicamente di tipo policlonale, e rappresenta l'esito di un aumentata produzione di tipi differenti di immunoglobuline da parte di diversi cloni di plasmacellule. Solo in pochi casi di LCan è stata

documentata invece una gammopatia monoclonale (paraproteinemia) (Giraudel et al. 2002; Antognoni et al., 2010).

Esempio di gammopatia policlonale

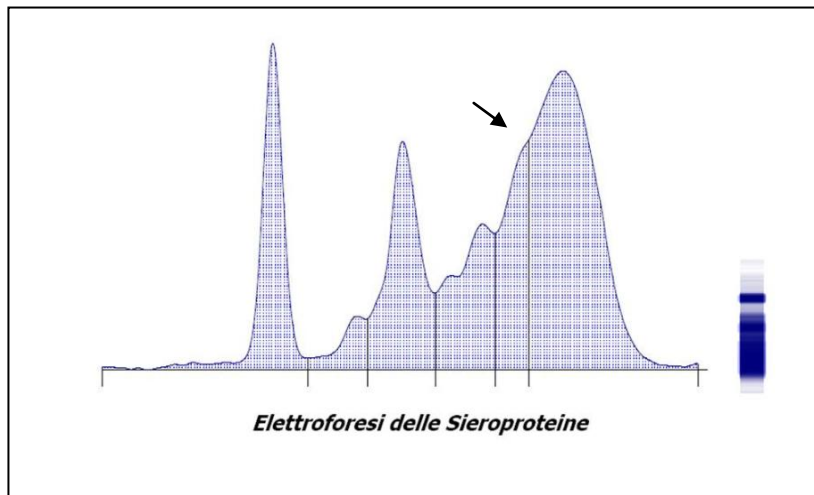


Fig. 5: Elettroforesi con gammopatia policlonale di un cane affetto da leishmaniosi incluso nel nostro studio. La freccia indica la presenza del “ponte” tra le β_2 e le γ globuline.

3.3.2. Le proteine di fase acuta

Proteine di fase acuta (APP). Tra le APP valutate in corso di leishmaniosi sia in medicina umana sia recentemente in medicina veterinaria vi sono l’aptoglobina, la proteina C reattiva, la ceruloplasmina e l’amiloide A sierica. In uno studio sono state valutate: aptoglobina, proteina C reattiva e ceruloplasmina in cani infetti asintomatici, infetti sintomatici e in un gruppo di controllo di animali sani per verificare un loro possibile ruolo nella diagnosi e prognosi della leishmaniosi. Rispetto ai soggetti sani, i cani con leishmaniosi presentano concentrazioni sieriche più elevate di APP, in particolare la proteina C reattiva si è dimostrata la più sensibile nel distinguere i cani malati (sintomatici e asintomatici) da quelli sani. La sensibilità della proteina C reattiva era del 93 % nei soggetti sintomatici e dell’82% nei soggetti asintomatici (Martinez-Subiela, 2002). L’Amiloide A sierica, invece, tra le altre proteine di fase acuta si è dimostrata essere la meno sensibile nel distinguere gli animali infetti da *Leishmania*, in quanto non sempre aumenta in corso di leishmaniosi (Martinez-Subiela, 2003). Alla luce di quanto detto sopra, si può affermare che le proteine di fase acuta sono dei parametri altamente sensibili, ma poco specifici perché possono aumentare in presenza di qualsiasi stato infiammatorio.

Tra i parametri da valutare nei cani affetti da *Leishmania* vi sono anche gli enzimi epatici: alanina sierica (ALT), fosfatasi alcalina (ALP) e aspartato aminotransferasi (AST). Tali parametri sono risultati aumentati nell'82% dei cani leishmaniosi (Slappendel, 1988).

3.3.3 Coagulazione

Accanto alle alterazioni dell'emostasi primaria determinate soprattutto da piastrinopatie e piastrinopenie, in corso di leishmaniosi sono riportate anche alterazioni dell'emostasi secondaria. In particolare, le valutazioni dei parametri coagulativi quali i tempi di coagulazione (aPTT e PT) hanno rilevato un aumento di aPTT, compatibile con un più veloce consumo dei fattori della via intrinseca a causa dell'attivazione della cascata infiammatoria (Cortese et al., 2006; Ciaramella et al., 2005).

Nel cane, secondo alcuni autori, livelli normali delle concentrazioni dei D-Dimeri fanno escludere l'ipotesi di una coagulazione intravasale disseminata (CID) (Ciaramella et al. 2005), che invece secondo altri autori è risultata una complicanza della leishmaniosi umana (Lomtadze, et al., 2005). In un recente studio, è stato indagato il coinvolgimento dell'emostasi secondaria utilizzando la tromboelastometria, tecnica che valuta le proprietà viscoelastiche del sangue durante il processo di polimerizzazione della fibrina e lisi del coagulo. L'utilizzo di questa metodica ha messo in evidenza in pazienti in remissione la presenza di uno stato di ipercoagulabilità segnalato dall'aumento di FDP (prodotti della degradazione della fibrina/fibrinogeno). Questo studio, a differenza degli studi citati precedentemente, dimostra in questi soggetti la presenza di uno stato di coagulazione intravasale disseminata compensata (Bruno et al., 2010).

Inoltre, per i pazienti nefropatici affetti da sindrome nefrosica, la perdita renale di fattori anticoagulanti (antitrombina III) associata a trombocitosi, ipoalbuminemia ed all'aumento dell'adesività piastrinica, conseguenti allo stato infiammatorio, predispongono l'instaurarsi di uno stato di ipercoagulabilità con conseguente tromboembolismo (Vaden and Grauer, 2011).

Capitolo 4

Diagnosi di Leishmaniosi nel cane

L'ampia varietà e aspecificità delle possibili manifestazioni cliniche e delle alterazioni clinico-patologiche in corso di LCan rende a volte complesso per il clinico formulare una diagnosi di leishmaniosi. L'applicazione di un approccio integrato che comprenda il segnalamento, l'anamnesi, i riscontri clinico-patologici e le indagini finalizzate ad identificare il parassita (metodi parassitologici o molecolari) o nel valutarne la risposta immunitaria da parte dell'ospite (sierologia) risulta quindi essenziale per formulare una diagnosi accurata (Paltrinieri et al., 2010).

La diagnosi di leishmaniosi può essere richiesta non solo per confermare o escludere la malattia in soggetti in cui è stato avanzato un sospetto clinico di malattia, ma anche a fini epidemiologici per indagare la presenza dell'infezione, come screening in una popolazione di cani sani che vivono in aree endemiche, per prevenire la trasmissione tramite trasfusioni di sangue da soggetti infetti o per evitare l'importazione di cani infetti in aree non endemiche e per monitorare la risposta al trattamento (G.S.L.C. 2007).

La scelta del test diagnostico da utilizzare varia quindi in funzione della ragione per cui viene richiesta la diagnosi: nei soggetti sintomatici è sufficiente ai fini diagnostici l'utilizzo di un test dotato di elevata specificità (sierologia, citologia) mentre nei cani asintomatici o oligosintomatici la formulazione della diagnosi può richiedere l'utilizzo di test con elevata sensibilità (metodiche molecolari).

4.1. Metodi diagnostici diretti

4.1.1 Citologia ed istologia

Classicamente la diagnosi di LCan è confermata attraverso la dimostrazione diretta del parassita. La *Leishmania* spp. può essere identificata sia attraverso esame citologico che istologico su campioni prelevati da diverse matrici.

L'indagine citologica andrebbe eseguita su campioni di tessuti/organi infetti:

- lesioni cutanee nodulari, papulari e ulcerative in cui il materiale viene prelevato tramite ago-fissione o ago-aspirazione e/o apposizione;

- midollo osseo o linfonodi in presenza di segni clinici o alterazioni clinico-patologiche riferibili ad un loro interessamento;
- liquidi biologici prelevati da sedi con lesioni (essudati cavitari in caso di pericardite, liquido sinoviale in caso di artrite e liquido cefalo-rachidiano in caso di interessamento del sistema nervoso).

I tessuti od organi in cui si rileva più facilmente la presenza del parassita con questa metodica sono in ordine decrescente di sensibilità diagnostica: midollo osseo, linfonodi, milza e sangue (G.L.S.C., 2007). Il test è molto specifico (Sp) ma poco sensibile (Se) soprattutto in soggetti asintomatici in cui vi è una ridotta carica parassitaria. La sensibilità dell'esame citologico può aumentare se viene eseguita contemporaneamente nel midollo osseo e nel linfonodo (arrivando fino ad un 90%) piuttosto che utilizzare midollo osseo (Se= 60-75%) e linfonodi (Se=30-50%), separatamente. Oltre all'identificazione del parassita nei tessuti indicati sopra, è importante valutare la presenza o meno di alterazioni citologiche compatibili con la leishmaniosi (Tab.4). Se l'esame citologico ha avuto esito negativo, il materiale per la citologia può essere utilizzato per la ricerca del genoma di *Leishmania* mediante PCR (Mancianti, 2010).

Di seguito sono riportate alcune foto scattate presso il laboratorio del Servizio di Patologia Clinica Veterinaria (SEPAC VET) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie che mostrano la presenza di *Leishmania* in preparati citologici provenienti da diverso materiale biologico.



Figura 6: *Esame citologico: linfonodo. Presenza di amastigoti all'interno dei macrofagi*

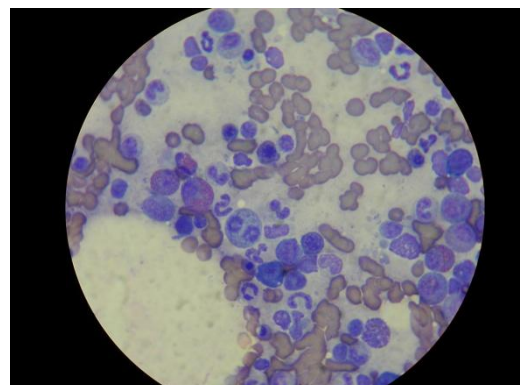


Fig. 7: *Esame citologico: midollo osseo. Nel midollo. Quadro suggestivo di leishmaniosi con presenza di eosinofili e plasmacellule.*

Gli amastigoti di *Leishmania* possono essere visualizzati anche mediante istologia eseguita su campioni biotici cutanei o di altri organi infetti. In associazione al parassita possono essere presenti, come accade nell'esame citologico, alterazioni istologiche "compatibili" con la leishmaniosi (Tab.4). Nel caso in cui si rilevino alterazioni istologiche, ma non sia possibile identificare il parassita sarebbe opportuno procedere con colorazioni immunocitochimiche, utilizzando anticorpi diretti contro antigeni di *Leishmania* o con metodiche molecolari (G.L.S.C., 2007°).

Riscontri patologici negli organi e fluidi corporei

- Infiammazione macrofagica (granulomatosa)
- Infiammazione neutrofilica-macrofagica
- Infiammazione linfoplasmocitaria
- Iperplasia reattiva degli organi linfoidi
- Presenza o meno di amastigoti di *Leishmania* intracellulari o extracellulari in numero variabile

Tab. 4: *Pattern citologici ed istologici suggestivi di LCan ritrovati negli organi o fluidi corporei (Solano-Gallego et al., 2009)*

4.1.2 Metodiche molecolari

Si basano sulla messa in evidenza di DNA parassitario su diversi campioni biologici. La tecnica utilizzata è la *Polymerase chain reaction* (PCR) che permette di amplificare sequenze specifiche del genoma di *Leishmania*. Le tecniche molecolari sono metodiche molto sensibili e risultano di particolare utilità come test di conferma nei casi che risultano dubbi, in animali sintomatici, o per determinare la carica parassitaria (Real Time PCR) sia a fini diagnostici che per il monitoraggio in corso di trattamento farmacologico anti-protozoario (Pennisi et al., 2005). Le tecniche molecolari possono essere utilizzate sia sui tessuti lesionati che su altri campioni biologici tra cui in ordine decrescente di sensibilità: midollo/linfonodo, cute, congiuntiva, buffy coat, sangue periferico (G.L.S.C., 2007a). In soggetti asintomatici l'interpretazione di un risultato PCR positivo deve essere eseguito alla luce di test sierologici quantitativi dal momento che spesso soggetti asintomatici e sieronegativi che vivono in zone endemiche possono albergare DNA parassitario in assenza di parassita integro e vitale.

Altri test diagnostici utilizzati in corso di studi sperimentali ma che non trovano applicazione in ambito clinico sono l'esame colturale, la xenodiagnosi e la prova biologica.

4.2 Metodi diagnostici indiretti

La diagnosi di LCan può essere emessa anche sulla base del riscontro di anticorpi specifici anti-leishmania. Gli anticorpi all'inizio dell'infezione mostrano alternanza di titoli bassi e sierologia negativa, per questo motivo la sierologia va rivalutata dopo qualche mese dall'infezione e in media dopo circa 6 mesi dalla fine della stagione di trasmissione (Mancianti, 2010). Le tecniche più utilizzate sono riportate di seguito.

4.2.1 Immunomigrazione rapida

Sono i kit diagnostici commercializzabili per uso ambulatoriale. Presentano scarsa sensibilità e una specificità, medio-alta (30-70%). È bene associare il kit rapido alla metodica di immunofluorescenza indiretta, in modo da avere anche il titolo anticorpale che potrebbe essere utile alla conferma diagnostica ed al monitoraggio terapeutico (G.L.S.C., 2007a).

4.2.2 Test Elisa

Il siero da esaminare è posto in 33 micropiastre rivestite di antigeni di *Leishmania*. In caso di positività si apprezza una reazione colorimetrica quantificabile tramite spettrofotometria. È un test specifico con sensibilità medio-alta (70-100%). La sensibilità e la specificità dell'ELISA possono, comunque, variare a seconda dell'antigene coinvolto (Solano-Gallego, 2009). Il vantaggio di questi test è di avere una lettura oggettiva (in quanto sono automatizzabili) e di permettere la quantificazione degli anticorpi (G.L.S.C, 2007a).

4.2.3 Test di immunofluorescenza indiretta (IFI).

È il test di referenza dell'*Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)* e dell'*Office International Des Epizooties (OIE)*. Il test viene eseguito ponendo il siero del paziente in esame a diluizioni successive su vetrino su cui sono presenti promastigoti di *Leishmania*. Gli anticorpi eventualmente presenti si legano ai promastigoti e la positività viene evidenziata tramite anti-anticorpi fluorescenti. Tramite diluizioni seriali del siero in esame è possibile determinare il titolo anticorpale. La sensibilità e specificità del test sono vicine al 100%, per questo è considerato il metodo sierologico di riferimento (Gradoni, 2002; Mettler et al, 2005; Mancianti et al., 1995). La sensibilità del test, diminuisce in caso di soggetti asintomatici (Scalone et al., 2002; Mettler et al., 2005; Oliva et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Ferroglio et al., 2007). Bisogna tener presente che sia l'ELISA sia l'IFI possono fornire risultati falsi positivi a basso titolo o da interpretare in aree endemiche per Leishmaniosi. La definizione di "basso" e "alto" titolo è relativa al titolo soglia

(titolo anticorpale oltre il quale un risultato positivo riflette un effettivo contatto con il parassita) del laboratorio di riferimento che effettua il test. Nella maggior parte dei laboratori, si considera “positivo” un titolo anticorpale di 1:40 (titolo soglia). In generale, si considerano “bassi” i titoli fino a 2 volte il titolo soglia del laboratorio di riferimento (titolo $\geq 1:80$) mentre si considerano “elevati” i titoli anticorpali che superano di almeno 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento (titolo anticorpale $\geq 1:160$) (G.L.S.C., 2007a).

Un alto titolo anticorpale, quindi, può permettere una ragionevole certezza diagnostica, in quanto è associato ad un’alta carica parassitaria e solitamente alla fase sintomatica della malattia (Reis et al., 2006b). Esistono, tuttavia, numerose eccezioni a tale regola come riportato ad esempio da Ferrer e collaboratori secondo i quali ad esempio cani infetti possono rimanere sieronegativi (Ferrer et al., 1995). Secondo gli stessi autori, inoltre, esisterebbero soggetti cosiddetti “low responders” il cui titolo anticorpale si modifica scarsamente nel corso della malattia.

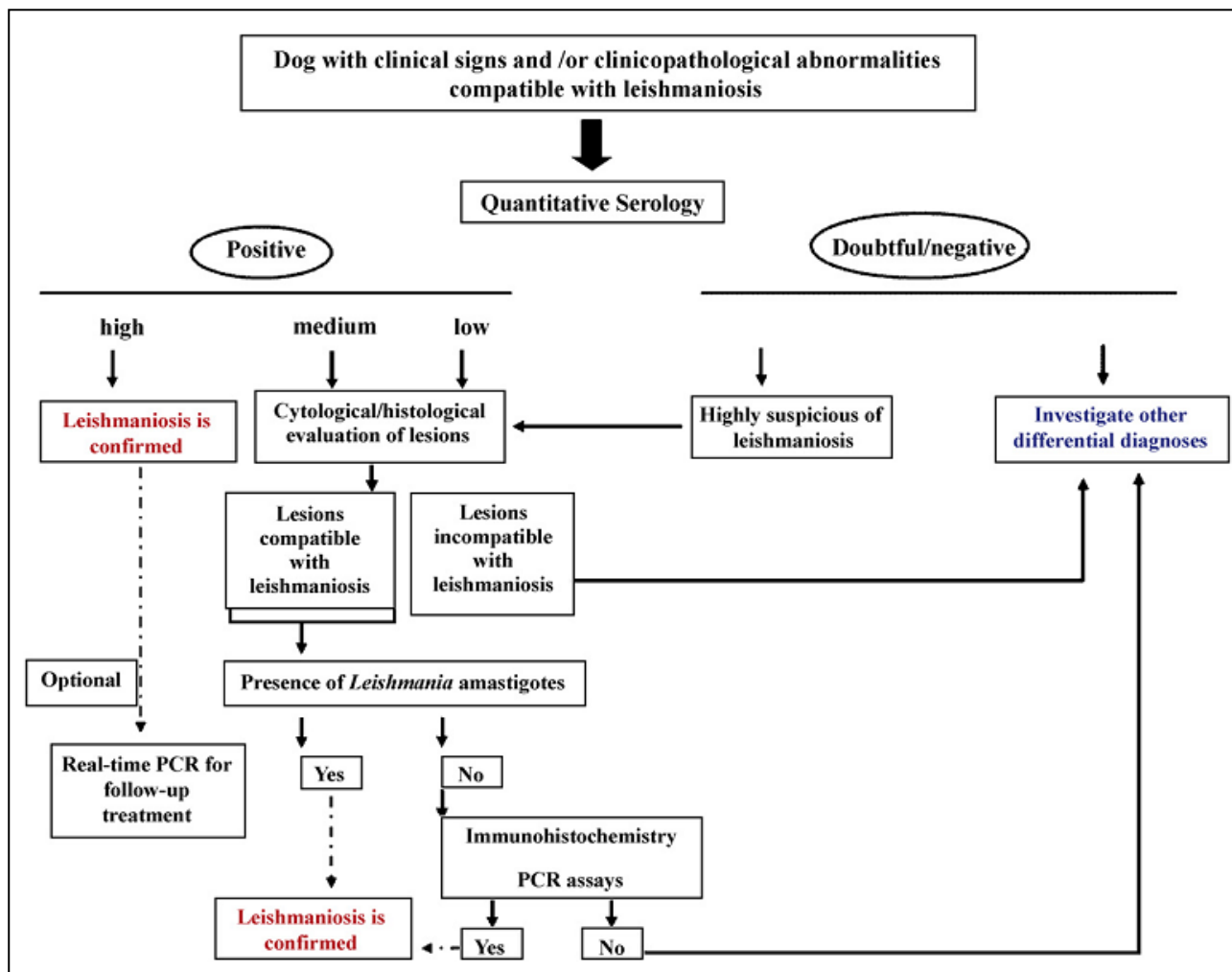


Fig. 8 : Algoritmo diagnostico in cani con sospetto clinico o clinicopatologico di leishmaniosi (Solano-Gallego, 2009)

Capitolo 5

Stadiazione, Trattamento, Profilassi

5.1 Stadiazione del paziente

L'infezione da *Leishmania* può evolvere, in tempi che vanno da poche settimane a molti mesi, in quadri di malattia estremamente variabili e polimorfi, non sempre facilmente classificabili. L'obiettivo del clinico al momento della diagnosi deve essere quello di inquadrare l'infezione-malattia nel suo stadio evolutivo, sia per consentire il corretto approccio terapeutico, sia per cercare di anticipare possibili evoluzioni verso stadi più gravi. Il gruppo di studio sulla leishmaniosi canina ha proposto recentemente delle linee guida per la classificazione della LCan basate su di un approccio integrato che comprenda: lo stato sierologico dell'animale, la presenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche (G.S.L.C., 2008).

Stadio A: CANE ESPOSTO o CON INFEZIONE SUB-PATENTE

Soggetti cl clinicamente sani (o con segni di altre patologie), nei quali test diagnostici cito-istologici, parassitologici e molecolari risultino negativi ma siano evidenziabili titoli anticorpali specifici, non superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento. I cani esposti all'infezione da *L. Infantum* sono solitamente soggetti che soggiornano o hanno soggiornato, durante una o più stagioni di trasmissione, in un'area dov'è accertata la presenza del flebotomo vettore

Stadio B: CANI CON INFEZIONE SUB-PATENTE

Soggetti cl clinicamente sani (o con segni di altre patologie) nei quali è dimostrabile la presenza del parassita, con metodi diretti (microscopia, coltura, PCR) ed in cui siano evidenziabili bassi livelli di titoli anticorpali specifici. Nelle zone endemiche, la sola positività alla PCR, eseguita da materiale cutaneo in assenza di lesione, durante la stagione di trasmissione, potrebbe non essere sufficiente a definire infetto un cane.

Stadio C: CANE MALATO

Cani infetti e cani con elevati titoli anticorpali specifici che mostrano uno o più segni clinici comunemente riscontrati in corso di leishmaniosi o chiaramente correlabili all'infezione in atto. Un cane infetto da *L. Infantum* può essere definito malato anche se, in assenza di segni clinici rilevabili, mostra alterazioni ematologiche, emato-biochimiche ed urinarie riferibili alla leishmaniosi o come prima, correlabili all'infezione in atto.

Stadio D: CANE MALATO CON QUADRO CLINICO GRAVE

Un cane infetto da *L. Infantum* può essere definito malato con un quadro clinico grave se: è stato già sottoposto a uno o più trattamenti anti-protozoari e non mostra remissione della sintomatologia o presenta frequenti recidive; affetto da è nefropatia proteinurica o insufficienza renale cronica; presenza gravi problemi concomitanti (patologie oculari gravi, artropatie gravi) che richiedono trattamento immunosoppressivo; concomitantemente affetto da gravi patologie (infettive, neoplastiche, endocrine o metaboliche).

Stadio E: CANE MALATO

E-a: Cane malato refrattario al trattamento specifico anti-leishmania

E-b: Cane malato sottoposto a trattamento, con recidiva precoce

Tab. 5: Classificazione dei cani infetti/malati ai fini terapeutici (Roura, 2010 modificato)

5.2 Farmaci utilizzati nella terapia della LCan

I principali farmaci anti-leishmania sono stati ideati e sviluppati in fasi pre-cliniche e cliniche esclusivamente per la terapia della leishmaniosi umana e solo successivamente sono stati studiati ed utilizzati nel cane. Nell'uomo questi farmaci garantiscono sia la guarigione clinica che quella parassitologica a differenza di quanto avviene nel cane dove *trials* clinici hanno dimostrato che la terapia consente una riduzione della carica parassitaria e la remissione della sintomatologia (in molti casi) ma solo eccezionalmente la guarigione parassitologica. Questo comporta in alcuni soggetti la comparsa di recidive della malattia a distanza di mesi dopo il termine del trattamento (G.S.L.C., 2008).

Gli scopi della terapia anti-*leishmania* devono essere: riduzione della carica parassitaria; controllo dei danni indotti dal parassita; ripristino della risposta immunitaria del cane; stabilizzazione nel tempo dei risultati ottenuti; trattamento delle recidive. Dalla revisione della letteratura il protocollo terapeutico che trova più ampi consensi è l'associazione Antimoniato N-metilglucammina e Allopurinolo. Tale associazione può essere proposta come prima scelta in tutti i soggetti degli stadi B, C e D al dosaggio di 100 mg/Kg SID SC per 4 settimane di Antimoniato di N-metilglucammina e di 10 mg/Kg BID PO di Allopurinolo per un periodo di almeno 4-6 mesi. Questo protocollo, applicato correttamente nei cani in stadio B e C determina quasi costantemente la guarigione clinica ed il suo mantenimento per periodi quasi sempre superiori ad un anno. Gli effetti collaterali sono di scarsa importanza (fatta eccezione per i fenomeni di istolesività dell'Antimoniato che a volte costringono ad interrompere la terapia).

Protocol	Drugs and dosages	Main side effects	Reference
1st line	N-methylglucamine antimoniate ^a (75–100 mg/kg/SID) for 4–8 weeks, S.C. + allopurinol (10 mg/kg/BID) for at least 6–12 months P.O.	Potential nephrotoxicity and cutaneous abscesses/cellulitis (N-methylglucamine antimoniate)	Denerolle and Bourdoiseau (1999), Ikeda-Garcia et al. (2007) and Manna et al. (2008a)
		Xantine urolithiasis (allopurinol)	Cavaliero et al. (1999), Koutinas et al. (2001), Pennisi et al. (2005b) and Plevraki et al. (2006)
2nd line	Miltefosine ^a (2 mg/kg/SID) for 4 weeks P.O. + allopurinol (10 mg/kg/BID) for at least 6–12 months P.O.	Vomiting, diarrhea (Miltefosine)	Manna et al. (2008b) and Miró et al. (in press)
	Allopurinol (10 mg/kg/BID) for at least 6–12 months P.O.	Xantine urolithiasis Xantine urolithiasis	Cavaliero et al. (1999), Koutinas et al. (2001), Pennisi et al. (2005b) and Plevraki et al. (2006)
3rd line	Amphotericin B ^b (0.5–0.8 mg/kg, I.V./SID/twice per week) for 2 months	Nephrotoxicity	Lamothe (2001) and Cortadellas (2003)
	Liposomal amphotericin B ^b (3 mg/kg/SID) for 5 consecutive days, I.V.	Transient nephrotoxicity	Oliva et al. (1995)
	Metronidazole (25 mg/kg/SID) + spiramycin (150,000 U/SID) for 3 months P.O.	Not described	Pennisi et al. (2005a)
	Marbofloxacin (2 mg/kg/SID for 1 month P.O.)	Not described	Rougier et al. (2008)

P.O.: per os; S.C.: subcutaneous; I.V.: intravenous.
^a Registered for veterinary use in Europe.
^b 1st line drug for Human Visceral Leishmaniasis in Europe; not recommended by WHO for veterinary use, to avoid drug parasite resistance.

Fig. 9: Protocolli terapeutici applicati correntemente nella LCan (Solano-Gallego et al., 2011)

5.3 Indicazioni per il trattamento

Secondo le linee guida proposte dal gruppo di studio sulla leishmaniosi canina, i cani che rientrano negli stadi A e B non necessitano di nessuna terapia farmacologica a meno che l'evidenza del parassita non sia associata a siero conversione (stadio B), in questi soggetti è necessario effettuare un nuovo monitoraggio sierologico e parassitario dopo 8-16 settimane dal primo riscontro di positività. Pazienti collocati nello stadio C e D devono essere trattati con farmaci anti *Leishmania* ed eventualmente con terapie di supporto suggerite dal quadro clinico del paziente. I pazienti collocati nello stadio E devono essere testati per altre patologie (malattie trasmesse da zecche) e qualora non si tratti di una falsa positività, il clinico dovrebbe rivalutare il protocollo terapeutico proposto o proporre un protocollo alternativo (G.S.L.C., 2008).

Clinical stages	Serology ^a	Clinical signs	Laboratory findings	Therapy	Prognosis
Stage I: mild disease	Negative to low positive antibody levels	Dogs with mild clinical signs such as peripheral lymphadenopathy, or papular dermatitis (Ordeix et al., 2005; Bottero et al., 2006)	Usually no clinicopathological abnormalities observed; normal renal profile: creatinine < 1.4 mg/dl; non-proteinuric: UPC < 0.5	Scientific neglect/ allopurinol alone/ allopurinol + meglumine antimoniate or miltefosine	Good
Stage II: moderate disease	Low to high ^b positive antibody levels	Dogs, which apart from the signs listed in stage I, may present: diffuse or symmetrical cutaneous lesions such as exfoliative dermatitis/onychogryphosis, ulcerations (planum nasale, footpads, bony prominences, mucocutaneous junctions), anorexia, weight loss, fever, and epistaxis (Petanides et al., 2008)	Clinicopathological abnormalities such as mild non-regenerative anemia, hypergammaglobulinemia, hypoalbuminemia, serum hyperviscosity syndrome (Petanides et al., 2008). Substage—(a) normal renal profile: creatinine < 1.4 mg/dl; non-proteinuric: UPC < 0.5. (b) Creatinine < 1.4 mg/dl; UPC = 0.5–1	Allopurinol + meglumine antimoniate or miltefosine	Good to guarded
Stage III: severe disease	Medium to high positive antibody levels	Dogs, which apart from the signs listed in stages I and II, may present signs originating from immune-complex lesions: vasculitis, arthritis, uveitis and glomerulonephritis	Clinicopathological abnormalities listed in stage II Chronic kidney disease (CKD) IRIS stage I with UPC > 1 or stage II (creatinine 1.4–2 mg/dl) (IRIS, 2006a)	Allopurinol + meglumine antimoniate or miltefosine Follow IRIS guidelines for CKD (IRIS, 2006b)	Guarded to poor
Stage IV: very severe disease	Medium to high positive antibody levels	Dogs with clinical signs listed in stage III. Pulmonary thromboembolism, or nephrotic syndrome and end stage renal disease	Clinicopathological abnormalities listed in stage II CKD IRIS stage III (creatinine 2–5 mg/dl) and stage IV (creatinine > 5 mg/dl) (IRIS, 2006a) Nephrotic syndrome: marked proteinuria UPC > 5	Allopurinol (alone) Follow IRIS guidelines for CKD (IRIS, 2006b)	Poor

^a Dogs with negative to medium positive antibody levels should be confirmed as infected with other diagnostic techniques such as cytology, histology/immunohistochemistry and PCR.
^b High levels of antibodies are conclusive of a diagnosis of CanL and are defined as three- to four fold increase of a well established laboratory reference cut-off.

Fig. 10: Stadiazione clinica della LCan basata sullo stato sierologico, i segni clinici, i riscontri laboratoristici ed il tipo di terapia e prognosi per ogni stadio clinico

(Solano-Gallego et al., 2011)

5.4 Monitoraggio del trattamento

L'utilizzo di farmaci anti-*leishmania* nella maggior parte dei pazienti comporta un miglioramento dei segni clinici e delle alterazioni emato-biochimiche entro poche settimane dall'inizio della terapia (Pennisi et al., 2005). Nonostante questo la prognosi per i cani infetti o malati varia tra i soggetti in funzione sia del quadro clinico al momento della diagnosi che come abbiamo visto soprattutto dalla presenza e dalla gravità della nefropatia (Solano-Gallego et al., 2009). Inoltre, la complessità della malattia, la forte compromissione immunitaria dei soggetti colpiti e l'impossibilità di garantire una guarigione parassitologica anche in seguito a lunghi periodi di trattamento con farmaci anti-*leishmania*, rende difficile la gestione di un cane affetto da leishmaniosi soprattutto per quanto riguarda il monitoraggio in corso di trattamento e la durata della terapia. Nonostante i numerosi studi effettuati sia in corso di infezione sperimentale che naturale, non si hanno ancora a disposizione parametri considerati specifici per monitorare la risposta al trattamento (Bianciardi et al., 2010). Essendo la malattia determinata principalmente oltre che dall'inefficienza della risposta cellulo-mediata ma soprattutto da una progressiva perdita di controllo della risposta umorale con produzione di elevate quantità di immunoglobuline alcuni autori hanno proposto l'utilizzo del quadro proteico elettroforetico e del rapporto albumine/globuline come punto chiave per stabilire l'interruzione della terapia anti-*leishmania* e per monitorarne l'efficacia (Ceci et al, 1985; Bizzetti et al., 1989). Tuttavia in letteratura vi sono dati molto variabili per quanto riguarda l'analisi delle diverse frazioni proteiche all'elettroforesi sierica, come anche sulla possibilità che vi sia una correlazione diretta tra i titoli anticorpali (anticorpi specifici anti-*leishmania*) e l'elettroforetogramma (Amasategui et al., 2003). Sia nell'uomo che nel cane in generale, dopo l'inizio del trattamento si assiste ad una riduzione graduale dei titoli anticorpali, tuttavia nella leishmaniosi canina questo riscontro non si è dimostrato costante e non sempre avviene in tempi brevi. In alcuni soggetti al contrario, nonostante ci sia una buona risposta clinica i titoli anticorpali specifici anti-*leishmania* possono rimanere elevati anche dopo diversi mesi. Tali risultati dimostrano pertanto che il monitoraggio dei titoli anticorpali specifici non possano essere considerati sensibili per monitorare l'efficacia del trattamento nei cani affetti da leishmaniosi (Ferrer et al., 1995). Così come riportato per i titoli anticorpali, anche la valutazione del rapporto A/G ha dato dei risultati incostanti: generalmente in corso di trattamento si è visto che il rapporto tende in media nel tempo a normalizzarsi, tuttavia anche la correlazione tra la normalizzazione del rapporto A/G ed il miglioramento del quadro clinico non ha mostrato un rapporto statisticamente significativo (Bianciardi et al. 2010).

Risultati interessanti sono stati ottenuti invece utilizzando le proteine di fase acute (APP) come marker per il monitoraggio e la diagnosi di eventuali recidive sia in corso di infezione sperimentale che di infezione naturale. Tra le APP in modo particolare la proteina C reattiva (CRP) si è dimostrata la più sensibile sia nel valutare l'efficacia del trattamento, con un riduzione significativa in corso di terapia, sia nel follow-up per identificare tramite un suo aumento la possibile comparsa di recidive (Martinez-Subiela et al., 2003; Sassanelli et al., 2007). Uno degli ultimi lavori riportati in letteratura prende in considerazione la misurazione di alcune APP e concomitantemente le concentrazioni di IgG ed IgM totali in corso di infezione sperimentale prima e durante trattamento anti-leishmania. I risultati ottenuti confermano ancora la sensibilità di CRP e di Hp nel monitoraggio della malattia mentre per quanto riguarda le immunoglobuline non è stata dimostrata una corrispondenza tra le loro concentrazioni ed il decorso della malattia durante il trattamento (Martinez-Subiela et al., 2011).

5.5 Cenni di Profilassi

La leishmaniosi canina è in molti paesi del mondo un problema non solo per la malattia che è in grado di produrre nel cane ma soprattutto rappresenta un aspetto serio di sanità pubblica dal momento che il cane rappresenta il principale reservoir del parassita per l'uomo in cui la malattia, se non trattata, può essere fatale. Le possibili strategie per il controllo della LCan sono individuabili in 3 punti: lotta agli insetti vettori e prevenzione della puntura; vaccinazione degli animali sani; eliminazione degli infetti/malati. L'organizzazione mondiale della sanità (WHO) raccomanda la soppressione dei cani infetti ma, allo stesso tempo riconosce le difficoltà etiche nell'attuare questa misura di controllo nei paesi in cui c'è maggiore sensibilità nei confronti degli animali per cui il dibattito è sempre aperto sulla decisione se trattare o sopprimere questi soggetti. Anche il controllo della popolazione di vettori è un obiettivo complesso da raggiungere dal momento che vi sono più specie di flebotomi implicati nella trasmissione dell'infezione. Nel cane le principali misure di profilassi sono mirate pertanto a limitare il morso del flebotomo mediante l'utilizzo di prodotti repellenti e all'utilizzo di vaccini nei soggetti sani.

5.5.1 Profilassi diretta

Le misure di profilassi diretta sono finalizzate a prevenire la diffusione dell'infezione tramite misure di controllo che limitino il contatto vettore-ospite mediante l'utilizzo nel cane di prodotti ad uso topico con effetto repellente nei confronti del flebotomo. Questa misura di controllo da una parte limita la possibilità che flebotomi infetti possano trasmettere la malattia a soggetti sani e dall'altra limita la diffusione del parassita quando il cane è già infetto. Risulta importante quindi applicare le misure preventive anche ai cani sottoposti a terapia perché nonostante questi possano

risultare clinicamente sani, continuano ancora ad essere infetti. Le specialità farmaceutiche con effetto repellente nei confronti del flebotomo sono prodotti a base di piretro idi (Tab.8). I piretroidi sono molecole ben tollerate nella maggior parte dei cani, in una minoranza di casi sono state osservate reazioni di ipersensibilità cutanea con eritema e prurito nel punto di applicazione. Per questi soggetti che vivono in aree in cui la leishmaniosi è endemica e su cui non è possibile utilizzare tali prodotti è consigliabile ridurre la permanenza all'aperto nelle ore notturne quando il flebotomo è maggiormente attivo. In alternativa, è possibile utilizzare delle misure di protezione meccanica utilizzando dei rifugi protetti da zanzariere a maglia fitta (Maroli et al., 2010).

Principio attivo	Somministrazione	Inizio protezione	Durata protezione
Permetrina (Exspot®)	Spot-on	24-48 ore	4 settimane
Permetrina+imidacloprid (Advantix®)	Spot-on	24-48 ore	4 settimane
Permetrina+Piriproxifene (Duowin®)	Spray	Immediata	3 settimane
Complesso deltametrina-trifenilfosfato (Scalibor®)	Collare (a lento rilascio)	5-6 giorni	5 mesi

Tab. 6 : *Sostanze utilizzate nella prevenzione della leishmaniosi canina (Solano-Gallego et al., 2011, modificato).*

5.5.2 Profilassi Indiretta

I vaccini utilizzati per la leishmaniosi canina sono vaccini di 2° generazione che utilizzano antigeni purificati di *Leishmania* (proteine e lipofosfoglicani con potere immunogenetico). Il primo vaccino (Leishmune®) registrato e commercializzato in Brasile è composto da glicoproteine di *Leishmania* (FML=fucose-mannose-ligand) e adiuvato con saponine (QS21). Il vaccino è in grado di prevenire lo sviluppo di gravi forme cliniche (con un'efficacia < 100%) riducendo allo stesso tempo l'infettività del flebotomo ed ha inoltre un effetto immunoterapeutico nei soggetti malati. Il secondo vaccino, disponibile in portogallo, è il caniLeish®. Questo vaccino è composto da ESPs (excreted-secreted proteins) e anche in questo caso sono state utilizzate come adiuvante le saponine (QS21) per la loro efficacia nello stimolare la risposta immunitaria di tipo Th1. Il canileish® sembra risultato sicuro sia in animali sani sia in soggetti sieropositivi; studi di campo utilizzando modelli d'infezione naturale hanno permesso di verificare la sua l'efficacia nel limitare lo sviluppo delle forme cliniche, riducendo di circa 3 volte il rischio per i cani di sviluppare un' infezione attiva e di

circa 4 volte di sviluppare la malattia. Il protocollo vaccinale ancora in fase di sperimentazione prevede la somministrazione di tre dosi a partire dai 6 mesi di età, con richiami di 3 settimane a cui segue il richiamo annuale. L'immunità si sviluppa a partire dalla quarta settimana dopo la terza iniezione. La somministrazione del vaccino è consigliata solo in animali sieronegativi, in quanto non è stato ancora provato la sua efficacia in animali sieropositivi (Oliva, 2011). Ad oggi sono necessari tuttavia ulteriori studi per verificare in modo più accurato l'efficacia e la sicurezza dei vaccini e del protocollo vaccinale.

CAPITOLO 6

SEZIONE SPERIMENTALE

1.Obiettivi

Lo studio sperimentale oggetto della tesi si è posto come primo obiettivo quello di valutare la leishmaniosi canina dal punto di vista clinico e clinicopatologico, con particolare riferimento alla nefropatia associata, attraverso un'indagine retrospettiva delle cartelle cliniche di cani condotti a visita presso l'Ospedale Didattico Veterinario. I dati sono stati riportati e analizzati tramite statistica descrittiva e in particolare sono stati considerati il segnalamento, l'anamnesi, la sintomatologia clinica ed i segni di laboratorio per poi analizzarne la frequenza delle principali alterazioni rilevate nella nostra realtà clinica e confrontarla con i dati riportati in letteratura. Successivamente la popolazione oggetto di studio è stata suddivisa in diversi gruppi:

- ✓ nefropatici e non nefropatici al fine sia di valutare la malattia renale in corso di leishmaniosi ed in particolare indagare le conseguenze di tale condizione a livello sistemico sia di confrontare tramite un'indagine statistica le alterazioni di laboratorio in questi pazienti con quelle presenti nei soggetti non nefropatici.
- ✓ anemici e non anemici

Il confronto tra questi gruppi è stato mirato inoltre all'identificazione di una eventuale correlazione tra il tipo di alterazione rilevata (nefropatia, anemia) e la gravità della malattia sistemica sottostante.

Un secondo obiettivo è stato quello di valutare la risposta immunitaria umorale in corso di leishmaniosi canina mediante la misurazione di Immunoglobuline G e Immunoglobuline M al momento dell'ammissione e nel follow-up in corso di trattamento anti-*leishmania* per indagare e comprendere meglio l'evoluzione della malattia al fine di applicare i risultati ottenuti nella pratica ed utilizzare le concentrazioni anticorpali come possibili biomarker per la remissione o la progressione della malattia.

2.Materiali e metodi

2.1.Criteri d'inclusione e selezione dei pazienti

Lo studio clinico proposto è stato condotto in modo retrospettivo su una coorte di pazienti condotti a visita presso il Dipartimento Clinico Veterinario e di Scienze Mediche Veterinarie dell' Università di Bologna dell'Alma Mater Studiorum nel periodo compreso tra Gennaio 2003 e Marzo 2012. I casi sono stati selezionati tramite il software gestionale in uso (Fenice 3.42) considerando la positività sierologica per *Leishmania spp.* $\geq 1:40$ mediante la metodica di Immunofluorescenza Indiretta (IFI) e almeno uno dei seguenti criteri:

- ✓ presenza di reperti clinici e clinicopatologici riferibili a leishmaniosi;
- ✓ individuazione diretta degli amastigoti di *Leishmania spp.* mediante esame citologico da matrici biologiche (puntati linfonodali e/o midollari, raschiato/citologia cutanea);
- ✓ positività alla polimerase chain reaction (PCR) per DNA di *Leishmania spp.*

I soggetti inclusi nello studio sono stati ulteriormente selezionati mediante i seguenti criteri valutati al momento dell'ammissione presso l'Ospedale Didattico Veterinario:

- ✓ presenza di cartelle cliniche complete;
- ✓ disponibilità di dati clinico-patologici, tra cui esame emocromocitometrico, biochimica clinica, esame chimico-fisico delle urine e proteinuria elettroforesi sierica, parametri coagulativi (ATIII, d-dimeri, fibrinogeno) proteine di fase acuta (CRP).

L'inserimento di un caso nello studio coincideva con l'ammissione presso l'Ospedale Didattico Veterinario. Tale condizione, non in tutti i soggetti corrispondeva necessariamente al momento della diagnosi eziologica.

I soggetti selezionati sono stati ulteriormente suddivisi in asintomatici (A), malati (ML), malati con patologie concomitanti (MLC) e nefropatici (KD). I soggetti A non presentavano segni clinici riferibili a leishmaniosi (indipendentemente dal titolo anticorpale); i soggetti ML presentavano segni clinici e clinicopatologici attribuibili a leishmaniosi; all'interno del gruppo ML i soggetti che presentavano segni clinici e clinico patologici attribuibili a leishmaniosi e una o più comorbidità sono stati classificati come MLC; i pazienti KD presentavano segni clinici e clinicopatologici riferibili a danno renale con presenza di proteinuria (rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria – UPC $>0,4$) e/o iperazotemia (creatinina sierica $>1,4$ mg/dl) associata peso specifico urinario “inadeguato” (<1030).

In base alle variazioni dei parametri elencati in seguito i pazienti sono stati ulteriormente suddivisi in diversi gruppi diagnostici:

- ✓ pazienti che presentavano **iperyglobulinemia** – l'iperyglobulinemia è stata definita come un aumento della concentrazione delle γ globuline stimata mediante valutazione elettroforetica, i pazienti affetti da iperyglobulinemia dovevano presentare valori di γ globuline $>0,78$ g/dl (I.R. 0,42-0,78 g/dl);
- ✓ pazienti con **peso specifico urinario inadeguato** – i soggetti con peso specifico “inadeguato” dovevano presentare P.S. <1030 , poiché tale valore può riflettere l'incapacità del rene di concentrare le urine.
- ✓ pazienti **anemici** – i soggetti sono stati considerati anemici o non anemici in base ai valori di ematocrito, in particolare gli “anemici” dovevano presentare valori di Hct $<37\%$ (I.R. 37-55%).

Le altre alterazioni clinicopatologiche (es.: leucopenia/leucocitosi, ipoalbuminemia, etc) che hanno permesso un'ulteriore classificazione diagnostica dei pazienti, sono state definite utilizzando gli intervalli di riferimento forniti dal laboratorio del Servizio di Patologia Clinica Veterinaria del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (vedi tabelle 12, 13,14). Tali risultati sono frutto di validazione interna e sono coerenti con quelli presenti in letteratura.

Tra i soggetti selezionati in base ai criteri d'inclusione/esclusione sono stati successivamente selezionati i pazienti sottoposti a trattamenti anti-*leishmania* per la misurazione di Immunoglobuline G (IgG) ed Immunoglobuline M (IgM) in base a:

- ✓ disponibilità di siero o plasma citrato al momento dell'ammissione;
- ✓ disponibilità di siero o plasma citrato in corso di follow-up dopo l'inizio della terapia anti-*leishmania*.

La misurazione delle IgG ed IgM è stata effettuata presso il Servizio di Patologia Clinica Veterinaria del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie avvalendosi di una metodica immunoturbidimetrica impiegata nell'uomo e recentemente validata dallo stesso laboratorio nella specie canina. Gli intervalli di riferimento sono frutto di una validazione interna e sono coerenti con quelli presenti in letteratura.

2.2.Determinazioni:

Per tutti i soggetti selezionati, quando disponibili sono stati presi in esame i seguenti parametri: valore Ematocrito (Hct); Emoglobina totale (Hb); Eritrociti (RBC); volume corpuscolare medio (MCV); concentrazione di emoglobina corpuscolare media (MCHC); Leucociti totali (WBC); Piastrine (PLT); profilo biochimico comprendente creatinina (CREA); Urea; Colesterolo; Aspartato Amino-Transferasi (AST); Alanina AminoTransferasi (ALT); Fosfatasi alcalina (SAP); Proteine totali (PT); Albumine (ALB); rapporto albumine/globuline (A/G) Bilirubina totale; Fosforo (P); Calcio (Ca); Potassio (K); Cloro (Cl); Sodio (Na); Proteina C reattiva (CRP); Ferro totale; Transferrina (TIBC); Saturazione della TIBC (Sat%), Fibrinogeno; Antitrombina III (ATIII); D-Dimeri (D-D); α 1-globuline, α 2-globuline, β 2-globuline e γ globuline; l'esame chimico fisico delle urine (comprendente almeno peso specifico urinario, pH e proteine urinarie) e del sedimento urinario. Con le matrici del surnatante urinario è stato effettuato un esame biochimico delle urine per valutare le proteine urinarie (uPT); creatinina urinaria (Crea) e albumina urinaria (uAlb) ed è stato successivamente calcolato il rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC); albumina urinaria/creatinina urinaria (UAC).

Metodica di prelievo, processazione e stoccaggio dei campioni

I prelievi di sangue sono stati eseguiti attraverso un sistema a vuoto Sarstedt® e quando possibile sono state raccolte:

- ▷ 1 aliquota di sangue in K₃-EDTA;
- ▷ 1 o più aliquote di sangue senza anticoagulante, con gel separatore, per ottenere il siero;
- ▷ 1 aliquota di sangue con Na-citrato.

I prelievi di urina sono stati eseguiti mediante cistocentesi, minzione spontanea o cateterismo vescicale.

Il sangue raccolto in K₃-EDTA con provette S-Monovette® Sarstedt è stato processato entro un'ora dal prelievo per l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico. Tale esame è stato ottenuto utilizzando i contaglobuli automatici *Hematology Self Cell Counter* modello Baker System 9120⁺_{AX}, Abbott CELL-DYN 3500 R e Siemens ADVIA® 2120 che si sono succeduti durante il periodo oggetto di studio presso il laboratorio. Prima delle determinazioni analitiche, i campioni in K₃-EDTA sono stati sottoposti ad agitazione tramite Vortex (Reamix 2789).

I parametri valutati sono stati: eritrociti (RBC/mm³), valore ematocrito (Hct%), emoglobina totale (Hgb g%), volume corpuscolare medio (MCV fl), contenuto medio di emoglobina (MCH pg),

concentrazione corpuscolare media di emoglobina (MCHC g%), ampiezza della distribuzione eritrocitaria (RDW), leucociti totali (WBC/mm³), piastrine (PLT/mm³), volume piastrinico medio (MPV), conta reticolocitaria assoluta e percentuale, indice di produzione reticolocitaria. Gli strisci di sangue eseguiti a fresco e colorati con *May-GrünWald-Giemsa* (Merk®) o *MGG-Quick Stain* (Bio-Optica) sono stati esaminati al microscopio al fine di valutare la morfologia eritrocitaria, la morfologia e la formula differenziale leucocitaria, la stima e la morfologia piastrinica nonché l'eventuale presenza di aggregati.

Il sangue raccolto in provette da siero (S-Monovette® Sarstedt con “gel clotting activator”) è stato immediatamente posto in termoblocco (THERMOBLOC, FALC) a 37°C e lasciato per 30 minuti. La separazione del siero è stata ottenuta attraverso centrifugazione per 10 minuti a 3000 × g.

Il siero è stato utilizzato per l'esecuzione del profilo biochimico comprendente ALT, AST, Fosfatasi alcalina, Creatinina, Urea, Fosforo, Glucosio, Bilirubina Totale, Acidi Biliari, GGT, Proteine Totali, Albumina, rapporto Albumina/Globuline, Calcio, Sodio, Potassio, Cloro, Ferro totale e per la determinazione delle Proteine di Fase Acuta (CRP, TIBC). Tutte le determinazioni sono il risultato di metodiche installate sull'analizzatore automatico OLYMPUS AU 400 precedentemente validate per il cane.

Il sangue in Na-citrato raccolto con S-Monovette® Sarstedt (provette allestite con Na-citrato in soluzione 0,11 mol/l, rapporto Na-citrato/sangue di 1 + 9) è stato processato in laboratorio entro 2 ore dal prelievo. La separazione del plasma citrato è stata ottenuta attraverso centrifugazione per 10 minuti a 3000 × g. Il surnatante è stato successivamente prelevato con pipette monouso, evitando lo strato eritrocitario sottostante, al fine di ottenere un campione di plasma povero di piastrine. Il plasma è stato utilizzato per la determinazione dell'Antitrombina III e dei D-Dimeri plasmatici attraverso metodiche installate sull'analizzatore automatico OLYMPUS AU 400 precedentemente validate per il cane.

Il campione di urina è stato sottoposto alla valutazione rifrattometrica per il peso specifico urinario e all'esecuzione di un esame chimico-fisico mediante il lettore automatico DIRUI H-500 Urine Analyzer e il Dipstick DIRUI H10. Infine, ciascun campione è stato sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a 1000 × g. Il surnatante è stato successivamente separato dal sedimento; quest'ultimo è stato valutato a fresco al microscopio. Il sedimento è stato definito “attivo” quando era rilevabile la presenza di leucociti, emazie e batteri e confermato attraverso valutazione citologica di un preparato citocentrifugato.

In accordo con le indicazioni riportate per le misurazioni specifiche e data la stabilità di siero, plasma e surnatante urinario, ove possibile, queste matrici sono state aliquotate e stoccate a -20°C o -80°C fino all'esecuzione delle ulteriori determinazioni richieste per lo studio.

Tutte le misurazioni sono state eseguite presso il laboratorio del Servizio di Patologia Clinica Veterinaria (SEPA VET) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna.

Ferro totale

Il ferro totale del campione di siero è stato misurato attraverso la metodica colorimetrica al Ferene di Sentinel CH (Sentinel REF KAL002-Iron Ferene).

Principio del test

Il Ferro in presenza di un sistema tampone a pH 4,8 viene liberato dalla transferrina e ridotto quantitativamente allo stato ferroso. Il Fe⁺⁺ così ottenuto forma con il complessante specifico Ferene S un composto colorato stabile la cui intensità di colore è proporzionale alla quantità di ferro presente nel campione in esame. L'interferenza dovuta al rame è eliminata utilizzando condizioni particolari di reazione e un mascherante specifico.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagenti 1	Tampone acetato 1,4 mol/l pH 4,8; Guanidina idrocloruro >4,5 mol/l; Mascherante specifico per Cu	Conservazione 2-6°C
Reagente 2	Ferene S >20 mmol/l; Acido ascorbico >0,5 mol/l	
Calibratore	Calibratore specifico contenuto nel kit OE66300	Conservazione 2-8°C fino a 7 gg 15- 25° C a 2 gg
Controllo	controlli Olympus Multicontrollo Cat.-N° ODC003, ODC004	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15- 25°C a 2 gg

Tab.7: Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione del Ferro

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo risulta lineare tra concentrazioni di ferro comprese tra 1 e 1000 µg/dl. La sensibilità analitica ovvero la concentrazione minima rilevabile diversa da zero è di 0,5 µg/dl.

Interferenze

Nessuna interferenza da ittero (bilirubina coniugata e non coniugata < 15 mg/dl), emolisi (emoglobina < 0,5 g/dl) e lipemia (trigliceridi < 1000 mg/dl).

Unsaturated Iron Binding Capacity (UIBC)

La UIBC è stata valutata mediante un test colorimetrico di tipo quantitativo (Olympus System Reagent – UIBC, OSR 61205).

Principio del test

La reazione alla base del test è che il Ferro del reagente R1 reagisca con il Nitroso-PSAP del reagente R2 per formare un complesso di colore verde. All'aggiunta del campione, una parte o tutti gli ioni Ferro del reagente R1, invece, si legano specificamente con la transferrina e pertanto non sono disponibili per la reazione colorata con il Nitroso-PSAP. La differenza delle assorbanze misurate con o senza l'aggiunta di campione rappresenta il valore di UIBC del campione in esame.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

UIBC Reagente	Soluz. Tampone Tris 180 mmol/l Ferro 6,9 µmol/l Nitroso-PSAP 176 µmol/l Cloruro di idrossilammonio 36 mmol/l Tiourea 175 mmol/l	Conservazione 2-6°C
Calibratore	Multicalibratore OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR Cat.N°.66300	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	Controlli Olympus Multicontrollo Cat.-N° ODC003, ODC004	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Tab.8: *Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione dell'UIBC*

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo risulta lineare tra concentrazioni di ferro comprese tra 55 e 450 µg/dl. La sensibilità analitica ovvero la concentrazione minima rilevabile diversa da zero è di 1,46 µmol/l.

Interferenze

Bilirubina: interferenza inferiore al 10% fino a 40 mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 5 g/l portano ad un'interferenza inferiore al 10%.

Lipidi: concentrazioni di lipidi (Intralipid®) aggiunti di 1000 mg/dl portano a una interferenza inferiore al 10%.

Transferrina

La transferrina sierica è stata misurata come *Total Iron Binding Capacity* (TIBC). La TIBC è calcolata sommando il Ferro totale alla UIBC:

Ferro Totale + UIBC = TIBC.

Saturazione percentuale della Transferrina (Sat%)

La saturazione percentuale della transferrina rappresenta la quota di transferrina che lega ferro. E' noto infatti che solo una parte del pool di transferrina circolante trasporta il ferro mentre la restante parte circola non saturata.

La Sat% è stata calcolata come segue:

$Fe \times 100/TIBC = Sat\%$

CRP

La concentrazione della CRP è stata valutata mediante una metodica immunoturbidimetrica (Olympus System Reagent C-REACTIVE PROTEIN OSR 6147), in uso in medicina umana e validata nel nostro laboratorio per il cane.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1	Soluzione tampone Tris (Idrossimetil) aminometano (pH 7,5) 80 mmol/l	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Reagente R2	Sodio cloruro 125 mmol/l Polietilenglicole 6000 1,5 % w/v Anticorpo anti-CRP umana di capra Conservante (sodio azide)	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Multicalibratore	Calibratore allestito presso il nostro laboratorio	
Controllo	Controlli allestiti presso il nostro laboratorio	

Tab.9: *Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la CRP*

Principio del metodo

Il campione di siero viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione anti-siero R2. La CRP reagisce e forma aggregati insolubili con il siero anti-CRP, l'assorbanza di tali aggregati è proporzionale alla concentrazione di CRP nel campione.

Linearità

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese nell'intervallo di 0,01-9 mg/dl.

Interferenze

Bilirubina: nessuna interferenza significativa fino a 40 mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 500 mg/dl portano a una interferenza significativa del 10%.

Lipidi: concentrazioni di lipidi (Intralipid®) aggiunti di 1000 mg/dl portano a una interferenza significativa del 20%.

Albumina

L'albumina è stata misurata con metodica Olympus (Olympus System Reagent – Albumin, OSR 6102). Tale metodica è di utilizzo in *routine* da diversi anni in medicina umana e veterinaria ed è nota come “metodo al verde di bromo-cresolo”.

Principio del test

Quando il verde di bromo cresolo reagisce con l'albumina, si forma un complesso colorato. L'assorbanza del complesso albumina-verde di bromo cresolo (di colore verde) viene misurata bicromaticamente (600-800nm) ed è proporzionale alla concentrazione di Albumina nel campione.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1	Soluzione tampone succinato (pH 4,2) 100 mmol/l	Conservazione: 2-25° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni
Reagente R2	Verde di bromocresolo 0,2mmol/l Conservante	Conservazione: 2-25° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni
Calibratore	OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR Cat.N°.66300	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	Controlli Olympus Cat.-N° ODC0003, ODC0004	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Tab. 10: Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione dell'Albumina

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 1,5 e 6,0 g/dl.

Interferenze

Bilirubina: interferenze inferiori al 10% fino a 40mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: interferenze inferiori al 10% fino a 4,5 g/l di emoglobina aggiunta.

Lipemia: interferenze inferiori al 10% fino a 8000 mg/dl di lipidi (Intralipid[®]) aggiunti.

Proteine totali urinarie (uTP)

Le proteine totali urinarie sono state misurate con metodica Olympus (Olympus System Reagent – Urinary/CSF protein, OSR 6170). Tale metodica è di utilizzo in *routine* da diversi anni in medicina umana e veterinaria ed è nota come “metodo al rosso di pirogallolo”.

Principio del test

Il rosso di pirogallolo si combina con il molibdato per formare un complesso rosso con un'assorbanza massima a 470nm. Il test è basato sulla variazione nell'assorbimento che si verifica quando il complesso rosso di pirogallolo-molibdato lega gli aminogruppi basici delle molecole proteiche dando origine a un complesso blu-porpora con un'assorbanza massima a 600nm. L'assorbanza di questo complesso è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteina nel campione.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1	Rosso di pirogallolo 47 µmol/l Molibdato di Na 320 µmol/l Acido succinico 50 mmol/l Benzoato di Na 3,5 mmol/l Ossalato di Na 1,0 mmol/l Metanolo 0,8% w/v	Conservazione: 2-8° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni
Calibratore	OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR Sieroalbumina umana 0,5 g/l	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	Controllo Sentinel diagnostics Dropper Level 1 e 2	Conservazione: 2-8° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni

Tab.11: *Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione dell'uTP*

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 1 e 200 mg/dl. La concentrazione minima rilevabile è di 0,7 mg/dl.

Interferenze

Interferenze inferiori al 10% per:

bilirubina 0,3mmol/l

glucosio 277mmol/l

acido urico 18 mmol/l

Rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC)

L'UPC è stato calcolato attraverso la formula seguente:

$$uPT(\text{mg/dl})/u\text{Crea}(\text{mg/dl}) = \text{UPC}.$$

uAlb

L'albumina urinaria è stata misurata con metodica Olympus (Olympus System Reagent – Microalbumin, OSR 6167). Tale metodica di tipo immunoturbidimetrico è di utilizzo in *routine* da diversi anni in medicina umana e nel nostro laboratorio. Il metodo è stato validato nel cane come riportato in letteratura (Gentilini et al., 2005)

Principio del test

Quando il campione viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2, l'albumina reagisce in modo specifico con anticorpi anti albumina umana dando origine ad un composto di aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione di albumina nel campione.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1 e R2	Soluz. Tampone Tris (pH 7,6) 71 mmol/l Anticorpi di capra antialbumina umana Conservante	Conservazione: 2-8° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni a 2-8°C
Calibratore	Calibratore allestito presso il nostro laboratorio	
Controllo	Controllo allestito presso il nostro laboratorio	

Tab. 12: *Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione dell'Albumina urinaria.*

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 1 e 30 mg/dl e ha una tolleranza al fenomeno prozona di 600 mg/dl.²

Interferenze

Glucosio: interferenza <5% fino a 3000mg/dl di glucosio aggiunto;

Creatinina: interferenza <5% fino a 300 mg/dl di cratinina aggiunta.

Rapporto creatinina urinaria/albumina urinaria (UAC)

L'UAC è stata calcolata attraverso la formula seguente:

$$uAlb(mg/dl)/uCrea(mg/dl) = UAC.$$

Creatinina

La creatinina (sierica e urinaria) è stata misurata con metodica Olympus (Olympus System Reagent – Creatinine, OSR 6178). Tale metodica è di utilizzo in *routine* da diversi anni in medicina umana e veterinaria ed è nota come “metodo di Jaffé”.

Principio del test

La Creatinina forma un composto giallo-arancio con acido picrico in un mezzo alcalino. La variazione nell'assorbanza a 520-800 nm è proporzionale alla concentrazione di creatinina nel campione.

Creatinina + acido picrico = complesso di picrato e creatinina

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione della creatinina

Reagente R1 e R2	Idrossido di sodio 120 mmol/l Acido picrico 2,9 mmol/l Conservante	Stabili tra 2 e 8°C a confezione integra fino a data di scadenza; aperti per 14 gg
Calibratore	Olympus System Calibrator Cat. n° 66300	Stabile tra 2 e 8°C fino a 7 gg; tra 15 e 25°C per 2 gg
Controllo	Controlli Olympus Cat. n° ODC0003 e ODC0004	Stabili tra 2 e 8°C fino a 7 gg; tra 15 e 25°C per 2 gg

Tab. 13: *Reagenti, controllo qualità e calibrazione della creatinina*

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni di creatinina comprese tra 0,06 e 25 mg/dl. Il metodo applicato sulle urine è lineare tra 1 e 400 mg/dl. La concentrazione minima rilevabile usando le impostazioni per il siero è di 0,027 mg/dl.

Interferenze

Ittero: interferenze inferiori al 10% fino a 40mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: interferenze inferiori al 3% fino a 5 g/l di emoglobina aggiunta.

Lipemia: interferenze inferiori al 10% fino a 600 mg/dl di lipidi (Intralipid®) aggiunti.

Proteine: interferenza inferiore al 6% tra 3 e 10 mg/dl di proteine aggiunte.

Fibrinogeno

Per la determinazione del Fibrinogeno plasmatico questa sperimentazione si è avvalsa di una metodica di tipo turbidimetrico (*FIBRINOGENO TURBIDIMETRICO*, MeDia diagnostics). La metodica è stata installata sull'analizzatore automatico *OLYMPUS AU400*.

Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazione:

Fibrinogeno Reagente 1	Solfato d'ammonio 0,42 mmol/l k ₃ EDTA 39,6 mmol/l Guanidina HCl 26,2 mmol/l PH 4,9	Conservazione: 2-6°C
Fibrinogeno Reagente 2	Solfato d'ammonio 1,57 mmol/l k ₃ EDTA 39,6 mmol/l Guanidina HCl 26,2 mmol/l PH 4,9	Conservazione: 2-6°C
Fibrinogeno Standard	Fibrinogeno umano liof. 2 g/l	Conservazione 2-6°C Stabilità: 7gg
Fibrinogeno Diluente	Citrato 15 µmol/l Eparina 800 U/l A. AminoCaproico 0,1 mmol/l Albumina bovina 40 g/l Tampone fosfato pH 7,4	Conservazione: 2-6°C Stabilità: 7gg
Fibrinogeno Controllo, livello basso	Fibrinogeno umano liof. 1,1 g/l	Conservazione: 2-6°C Stabilità: 7gg

Tab. 14: *Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazioni per la determinazione del Fibrinogeno.*

Principio del test:

L'aggiunta di Ammoniosolfato, EDTA e Guanidina cloridrato determina la precipitazione del Fibrinogeno presente all'interno del campione di plasma citrato. L'analizzatore misura tale

variazione turbidimetrica dopo aver valutato il cosiddetto **bianco campione** al fine di evitare le interferenze da bilirubina, emoglobina o chilomicroni.

Linearità:

La metodica è lineare da 0 a 9,0 g/l. I campioni contenenti valori superiori devono essere diluiti (1+2) con il **Diluente Fibrinogeno** e rivalutati.

Altri dati:

- Temperatura 25°C;
- Lunghezza d'onda 340nm;

Antitrombina III

L'attività della **Antitrombina III** è stata determinata attraverso una metodica di tipo cromogenico (*Antitrombina III*, Roche Diagnostics GmbH) automatizzata sull'analizzatore *OLYMPUS AU 400*.

In questa sperimentazione, l'attività di AT III nel cane è stata espressa in percentuale rispetto ad un plasma di controllo umano.

Reagenti e Controllo di Qualità:

Reagente R1 Reattivo Trombina	Tampone TRIS/HCl 100 mmol/l Eparina (suina) 2 U/ml Aprotinina(bov.) 6,5 U/ml NaCl 270 mmol/l Trombina(bov.) 0,38 U/ml	Conservazione: 2-8°C Stabilità: 28 gg refrigerato sull'analizzatore
Reagente R2 Reattivo Starter (substrato cromogeno)	MeOCO-gli-pro-arg-pNA•AcOH 1,8 mmol/l	Conservazione: 2-8°C Stabilità: 28 gg refrigerato sull'analizzatore
PreciChrom I/II (controllo basso, controllo alto)	Plasma citrato umano liofilizzato a concentrazione nota di AT III (basso 41%, alto 84%)	Stabilità (ricostituito): <ul style="list-style-type: none"> • 8 ore a 25°C • 5 gg a +4°C • 28 gg a -20°C

Tab. 15: *Reagenti e Controlli di Qualità per la determinazione dell'AT III.*

Calibrazione (a 2 punti):

Calibratore S1 (bianco)	NaCl 0,9%	
Calibratore S2: Precimat Chromogen	Plasma citrato umano liofilizzato a concentrazione nota di AT III (92%)	Stabilità (ricostituito): <ul style="list-style-type: none">• 8 ore a 25°C• 5 gg a 2-8°C• 28 gg a -20°C

Tab. 16: Calibrazione per la determinazione dell'AT III.

Principio del test:

ATIII + Eparina → (ATIII-Eparina)+Trombina_{in eccesso} →

→(ATIII-Eparina-Trombina)+Trombina_{residua} →

→ Trombina_{residua}+ substrato cromogeno → p-nitroanilina(cromogeno)

L'intensità della reazione colorimetrica, inversamente proporzionale all'attività antitrombinica, è valutata dall'analizzatore che la esprime in attività plasmatica percentuale.

Linearità:

La metodica è lineare tra 20 e 150% di attività di ATIII. Nel caso in cui l'attività del campione in esame superi il 150%, l'analizzatore diluisce il campione e ricalcola il valore.

Interferenze:

- Ittero (I): nessuna interferenza significativa fino ad un indice I di 29 (bilirubina coniugata e non coniugata 29 mg/dl circa);
- Emolisi (H): nessuna interferenza significativa fino ad un indice H di 1000 (emoglobina 1000 mg/dl circa);
- Lipemia (L) (Intralipid): nessuna interferenza significativa fino ad indice L di 1250 (trigliceridi 2500 mg/dl circa);
- Irudina (antitrombotico): concentrazioni di 1 mg/ml di irudina portano ad un valore di AT III falsamente elevato del 5% circa.

Altri dati:

- Temperatura 25°/30°/37°C
- Lunghezza d'onda 660 nm – 405 nm.

D-Dimeri

La determinazione dei **D-dimeri** è stata ottenuta utilizzando la nuova metodica *Tina-quant*[®] D-Dimero della Roche Diagnostics GmbH. Tale metodica utilizza un principio immunoturbidimetrico al lattice. L'applicazione al cane di metodiche a principio immunologico messe a punto per la medicina umana si basa sull'esistenza di una cross-reattività valutata in precedenti studi. Si deve ricordare che *in vivo*, una degradazione completa della Fibrina a dimeri D, avviene soltanto a seguito di lisoterapia (es.: t-PA mediata). Per questo motivo, gli anticorpi anti-D-dimero si legano ai cosiddetti **Oligomeri X** in cui, comunque, sono presenti i determinanti antigenici caratterizzati dalla presenza del legame covalente (Cross-linked Domain).

Reagenti e Controllo di Qualità:

Reagente R1 Tampone	Tampone TRIS/HCl 370 mmol/l NaCl 267 mmol/l PH 8,2	Conservazione : 2-8°C Stabilità : 28 gg refrigerato sull'analizzatore
Reagente R2 Sospensione di anti-D-dimero-latex	Particelle di latex rivestite di anticorpi monoclonali anti-D-dimero umano (topo) 0,15% Tampone TRIS/HCl 10 mmol/l	Conservazione : 2-8°C Stabilità : 28 gg refrigerato sull'analizzatore
D-DIMER Control I/II (controllo basso, controllo alto)	Siero umano liofilizzato a concentrazione nota di D-dimero (basso 0,88µg/dl, alto 4,19 µg/dl)	Conservazione 2-8°C Stabilità (ricostituito): • 1gg a 15-25°C • 14gg a 2-8°C

Tab. 17: Reagenti e Controllo di Qualità per la determinazione dei D-Dimeri.

Calibrazione (manuale, 6 diluizioni):

Zero Standard (f 1)	Matrice di siero umano	Conservazione: 2-8°C Stabilità: 1gg a 15-25°C
D-DIMER Calibrator (f 2)	Frammenti (umani) contenenti D-Dimeri in matrice di siero umano a concentrazione specifica per ogni lotto	Conservazione 2-8°C Stabilità: 1gg a 15-25°C

Tab. 18: Calibrazioni per la determinazione dei D-Dimeri.

Principio del test:

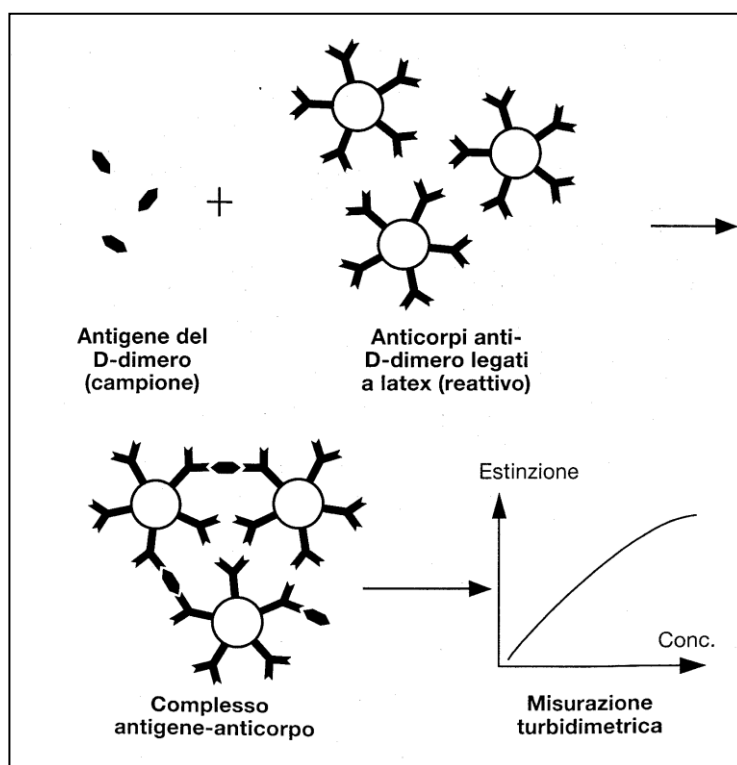


Fig. 12 : Principio del test immunoturbidimetrico al lattice per la determinazione dei D-Dimeri.

Linearità: la metodica è lineare tra 0,15 e 9,0 µg/ml. Concentrazioni superiori necessitano di diluizione (es.: 1+1) con NaCl 0,9%.

Interferenze:

- Ittero (I): nessuna interferenza significativa fino ad un indice I di 20 (bilirubina coniugata e non coniugata 20 mg/dl circa);
- Emolisi (H): nessuna interferenza significativa fino ad un indice H di 500 (emoglobina 500 mg/dl circa);
- Lipemia (L) (Intralipid): nessuna interferenza significativa fino ad un indice L di 750 (trigliceridi 1500 mg/dl circa);
- nessuna interferenza da fattori reumatoidi < 100 UI/ml;
- nessuna interferenza da eparina < 1,5 UI/ml;
- nessuna interferenza da farmaci documentata (31 farmaci di frequente impiego);
- alti livelli di IgM (es.: mieloma) possono portare a risultati falsamente elevati;
- in corso di lisoterapia (t-PA mediata) elevate concentrazioni di frammenti D-D possono condurre a risultati diminuiti (effetto “prozone”).

Altri dati:

- sensibilità analitica: 0,04 µg/ml;
- temperatura: 37°C;
- lunghezza d’onda: 0-700 nm;

Elettroforesi sierica

L’elettroforesi sierica è stata eseguita in gel di agarosio utilizzando il kit Hydragel PROTEIN(E) della Sebia, applicato su strumento per elettroforesi Hydrasys, Sebia (Sebia, Milano).

Metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI)

Per la metodica di immunofluorescenza indiretta ci si è avvalsi del kit FLUO LEISHMANIA (Agrolabo s.p.a.) disponibile presso il Servizio di Patologia Clinica Veterinaria (SEPAC VET).

IgG

Metodica utilizzata

Per tutti i soggetti è stata eseguita la determinazione quantitativa delle IgG tramite un metodo di tipo immunoturbidimetrico creato per l'uomo, e da noi applicato al cane. Lo strumento che è stato utilizzato è l'analizzatore per biochimica clinica OLYMPUS AU 400 (OSR61172) secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Eseguendo il test su una specie diversa dall'uomo è stato necessario procedere alla validazione del test stesso e modificarne in parte l'applicativo. La validazione della metodica è stata ottenuta con procedure di validazione standardizzate. Le specifiche riportate di seguito si riferiscono alla metodica umana.

Reagenti utilizzati nel test: contenuto e composizione

I reagenti utilizzati nel test sono R1 (4x22ml) e R2 (4x20ml), rispettivamente la soluzione buffer e la soluzione antisiero, la composizione dei reagenti è riportata in **Tabella 19**.

Buffer Tris (pH 7,2)	48 mmol/L
Polietilenglicole 6000	3,1 %
Anticorpi di capra anti-IgG	In base al titolo

Tab. 19

I reagenti sono stabili a confezione integra fino alla data di scadenza indicata, se conservati a temperature comprese tra +2 e +8 °C. Una volta aperta la confezione i reagenti sono stabili nello strumento per 90 giorni.

Principio del metodo

Quando un campione viene miscelato con la soluzione buffer R1 e la soluzione antisiero R2, l'IgG umana reagisce in modo specifico con anticorpi anti-IgG umane dando origine a aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione di IgG nel campione. L'applicativo è riportato in **Figura 13**.

Specific Test Parameters											
General: LIH ISE Range											
Test Name:		IgG		<		>		Type:	Serum	Operation:	Yes
Sample:	Volume	2	µL	Dilution	0	µL	Pre-Dilution Rate:	1			
Reagents:	R1 Volume	110	µL	Dilution	190	µL	Min OD	Max OD			
	R2 Volume	100	µL	Dilution	40	µL	Reagent OD limit:	L	H		
Wavelength:	Pri.	600	▽	Sec.	None	▽	First L	-0.1	First H	1.5	
Method:	END		▽				Last L	-0.1	Last H	1.5	
Reaction slope:	+		▽				Dynamic Range:	L	0.75*	H	30.0*
Measuring Point 1:	First	0		Last	23		Correlation Factor:				
Measuring Point 2:	First	0		Last	10		A	1	B	0	
Linearity:			%				On-board stability period:	90			
No Lag Time:			▽								

Fig. 13: Applicativo della metodica per la misurazione delle IgG nell'uomo.

Campioni utilizzabili e stabilità della metodica

Siero e plasma EDTA o eparinizzato. Le IgG sono stabili nel siero e nel plasma per 8 mesi se conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8°C e per 4 mesi se conservato a una temperatura compresa tra 15 e 25°C. Evitare l'uso di campioni fortemente lipemici.

Linearità

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 75-3000 mg/dl (0,75 e 30,0 g/l). la curva di calibrazione è riportata in **Figura 14**

Precisione

I seguenti dati sono stati ottenuti con un analizzatore AU400 utilizzando 3 pool di siero analizzati nell'arco di 20 giorni. I valori ottenuti sono riassunti in **Tabella 19**

Sensibilità

Il livello minimo rilevabile dall'analizzatore è stimato a 4 mg/dl.

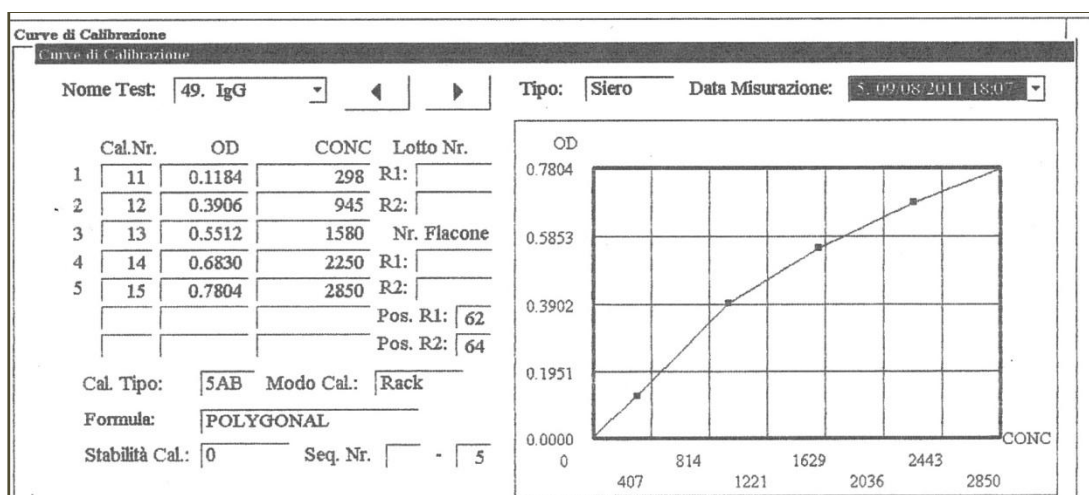


Fig. 14: Curva di calibrazione della metodica utilizzata per la misurazione delle IgG nel siero umano

N=80	INTRA-ANALISI			TOTALE	
Media, g/l	SD	CV%	SD	CV%	
4,31	0,05	1,14	0,14	3,29	
10,88	0,16	1,45	0,38	3,49	
21,73	0,49	2,24	1,01	4,66	

Tab. 19: Precisione della metodica utilizzata. I Coefficienti di Variabilità (CV%) calcolati sono inferiori al 5%.

Interferenze sul siero

Ittero: interferenza inferiore al 3% fino a 40 mg/dl di bilirubina.

Emolisi: interferenza inferiore al 3% fino a 500 mg/dl di emoglobina.

Lipemia: interferenza inferiore al 10% fino a 1000 mg/dl di intralipid®.

Fattore reumatoide: interferenza inferiore al 10% fino a 1200 IU/ml.

Limitazione

Il reagente Olympus IgG è stato ottimizzato per ridurre il rischio di un fenomeno di inibizione in presenza di concentrazione di immunoglobuline abnormemente elevate (effetto prozona). I campioni con concentrazioni molto alte di IgG (> 30000 mg/dl policlonali) potrebbero produrre risultati bassi non corretti senza generare l'appropriato allarme "Z", che indica un eccesso di antigene nel campione. Quando si esegue il test di campioni elevati su analizzatori del sistema AU è possibile ottenere indicatori "F" o una combinazione di indicatori "F" e "Z". Tali campioni devono

essere diluiti con soluzione fisiologica in modo da rientrare nella zona centrale della gamma di misurazione. I campioni che presentano caratteristiche anomale al controllo visivo, in particolare torbidità, possono produrre risultati atipici.

IgM

Metodica utilizzata

Per tutti i soggetti è stata eseguita la determinazione quantitativa delle IgM tramite un metodo di tipo immunoturbidimetrico creato per l'uomo, e da noi applicato al cane. Lo strumento che è stato utilizzato è l'analizzatore per biochimica clinica OLYMPUS AU 400 (OSR61172), secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Eseguendo il test su una specie diversa dall'uomo è stato necessario procedere alla validazione del test stesso e modificarne in parte l'applicativo. La validazione della metodica è stata ottenuta con procedure di validazione standardizzate. Le specifiche riportate di seguito si riferiscono alla metodica umana.

Reagenti utilizzati nel test: contenuto e composizione

I reagenti utilizzati nel test sono R1 (4x22ml) e R2 (4x20ml), rispettivamente la soluzione buffer e la soluzione antisiero. La composizione dei reagenti è riportata in **Tabella 20**.

Buffer Tris (pH 7,2)	50 mmol/L
Polietilenglicole 6000	3,5 %
Anticorpi di capra anti-IgM	In base al titolo

Tab. 20

I reagenti sono stabili a confezione integra fino alla data di scadenza indicata, se conservati a temperature comprese tra +2 e +8 °C. Una volta aperta la confezione i reagenti sono stabili nello strumento per 90 giorni.

Principio del metodo

Quando un campione viene miscelato con la soluzione buffer R1 e la soluzione antisiero R2, l'IgM umana reagisce in modo specifico con anticorpi anti-IgM umane dando origine a aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione di IgM nel campione. L'applicativo è riportato in **Figura 15**.

Specific Test Parameters										
General		LIH	ISE	Range						
Test Name:	IgM			<	>	Type:	Serum		Operation:	Yes
Sample:	Volume	2	μL	Dilution	0	μL	Pre-Dilution Rate:	1		
Reagents:	R1 Volume	70	μL	Dilution	115	μL	Min OD	Max OD		
	R2 Volume	55	μL	Dilution	10	μL	L	H		
Wavelength:	Pri.	340	▽	Sec.	800	▽	Reagent OD limit:			
Method:	END						First L	-0.1	First H	1.5
Reaction slope:	+						Last L	-0.1	Last H	1.5
Measuring Point 1:	First	0		Last	27		Dynamic Range:			
Measuring Point 2:	First	0		Last	10		L	0.2*	H	5.0*
Linearity :							Correlation Factor:			
No Lag Time:							A	1	B	0
							On-board stability period:	90		

Fig. 15: Applicativo della metodica per la misurazione delle IgM nell'uomo.

Campioni utilizzabili e stabilità del campione

Siero e plasma EDTA o eparinizzato. Le IgM sono stabili nel siero e nel plasma per 4 mesi se conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8°C e per 2 mesi se conservato a una temperatura compresa tra 15 e 25°C.

Linearità

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 20-500 mg/dl (0,2 e 5,0 g/l)

Precisione

I seguenti dati sono stati ottenuti su un analizzatore AU400 usando 3 pool di siero analizzati nell'arco di 10 giorni. I valori ottenuti sono riassunti in **Tabella 21**.

N=80	INTRA-ANALISI		TOTALE	
	Media, g/l	SD	CV%	SD
0,48	0,01	1,69	0,02	3,44
1,14	0,02	1,36	0,04	3,29
2,17	0,05	2,19	0,09	4,08

Tab. 21: Precisione della metodica utilizzata. I Coefficienti di Variabilità (CV%) calcolati sono inferiori al 5%.

Sensibilità

Il livello minimo rilevabile dall'analizzatore è stimato a 10 mg/dl

Interferenze sul siero

Ittero: interferenza inferiore al 10% fino a 40 mg/dl di bilirubina.

Emolisi: interferenza inferiore al 10% fino a 500 mg/dl di emoglobina.

Lipemia: interferenza inferiore al 10% fino a 200 mg/dl di intralipid®

Limitazioni

Il reagente Olympus IgM è stato ottimizzato per ridurre il rischio di un fenomeno di inibizione in presenza di concentrazione di immunoglobuline anormalmente elevate. I campioni con concentrazioni molto alte di IgM (> 10000 mg/dl policlonali) potrebbero produrre risultati bassi non corretti senza generare l'appropriato allarme "Z", che indica un eccesso di antigene nel campione. Quando si esegue il test di campioni elevati su analizzatori del sistema AU è possibile ottenere indicatori "F" o una combinazione di indicatori "F" e "Z". Tali campioni devono essere diluiti con soluzione fisiologica in modo da rientrare nella zona centrale della gamma di misurazione. I campioni che presentano caratteristiche anomale al controllo visivo, in particolare torbidità, possono produrre risultati atipici.

Citologia

Per la colorazione citologica dei preparati ottenuti da linfonodi, cute, midollo osseo e milza è stata utilizzata la colorazione *May-GrünWald-Giemsa* (Merk®) per citologia.

2.3. Analisi statistica

Per l'analisi statistica questa sperimentazione si è avvalsa del software per statistica medica MedCalc® 9.5.2.0. I dati sono stati espressi come statistica descrittiva. I risultati dei diversi gruppi sono stati confrontati attraverso il *Mann-Whitney U test* per dati non parametrici e attraverso ANOVA non parametriche (Friedman test e Kruskal-Wallis test). Le variabili sono state correlate utilizzando il coefficiente di correlazione di Spearman per dati non parametrici. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per $p < 0,05$.

I grafici "*box-and-whiskers*" inseriti rappresentano la mediana come linea centrale all'interno del box, i valori di massimo e minimo come linee estreme e suddividono la popolazione in quattro quartili.

3. Risultati

3.1. Pazienti selezionati

In base ai criteri d'inclusione/esclusione utilizzati sono stati selezionati 181 pazienti; di questi 7/181 (3,8%) sono stati classificati come asintomatici (A), 174/181 (96,1%) come malati (ML), di cui 49/181 (27%) come malati con patologie concomitanti (MLC). Le patologie concomitanti più rappresentate sul totale di 49 soggetti erano poliartriti ed altre malattie autoimmuni-immunomediate (12%), ehrlichiosi (10%), dermatiti allergiche (8%) e borreliosi (2%).

Nel periodo oggetto di studio (Gennaio 2003 - Settembre 2011) sono stati visitati presso le strutture afferenti all'Ospedale Didattico Veterinario una stima di 7493 cani; pertanto la prevalenza complessiva stimata risulta essere del 2,5 %.

I soggetti nefropatici (KD) sono stati scelti da un totale di 147 pazienti, poiché la concentrazione di creatinina sierica e un'analisi urinaria completa erano disponibili per 171/181 e per 147/181 soggetti, rispettivamente. I soggetti KD sono risultati 77/147 (52%).

Il titolo anticorpale era disponibile per 152/181 soggetti e variava da 1:40 a 1:1280 con mediana di 1:640. L'endpoint della titolazione è stato fissato a 1:1280, pertanto i titoli anticorpali maggiori di 1:1280 sono stati comunque considerati come uguali a 1:1280. La distribuzione del titolo anticorpale nei pazienti selezionati è riportata nel grafico 1.

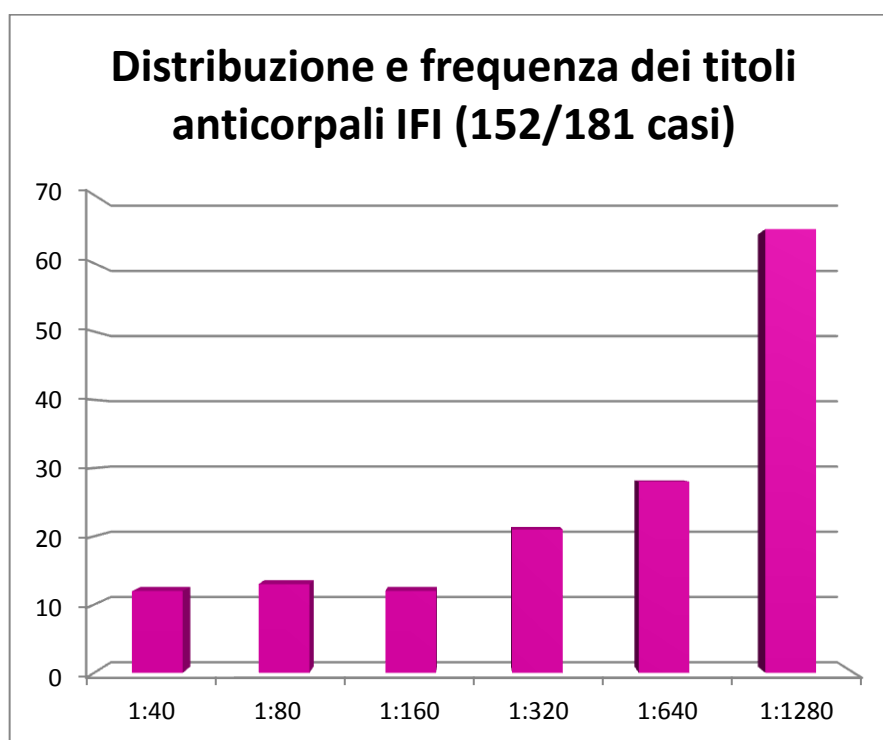


Grafico1 : Distribuzione percentuale del titolo anticorpale nella popolazione di studio.

L'identificazione degli amastigoti di *Leishmania* è stata effettuata tramite esame citologico in 103/181 pazienti, mentre 1/181 pazienti erano positivi alla PCR.

3.2. Risultati di età, sesso, razza

L'età dei soggetti selezionati variava da 5 a 174 mesi (5 mesi - 14 anni) con un'età media e mediana rispettivamente di 66 e 60 mesi (5,5-5 anni). La distribuzione dell'età dei soggetti è rappresentata nel grafico 2.

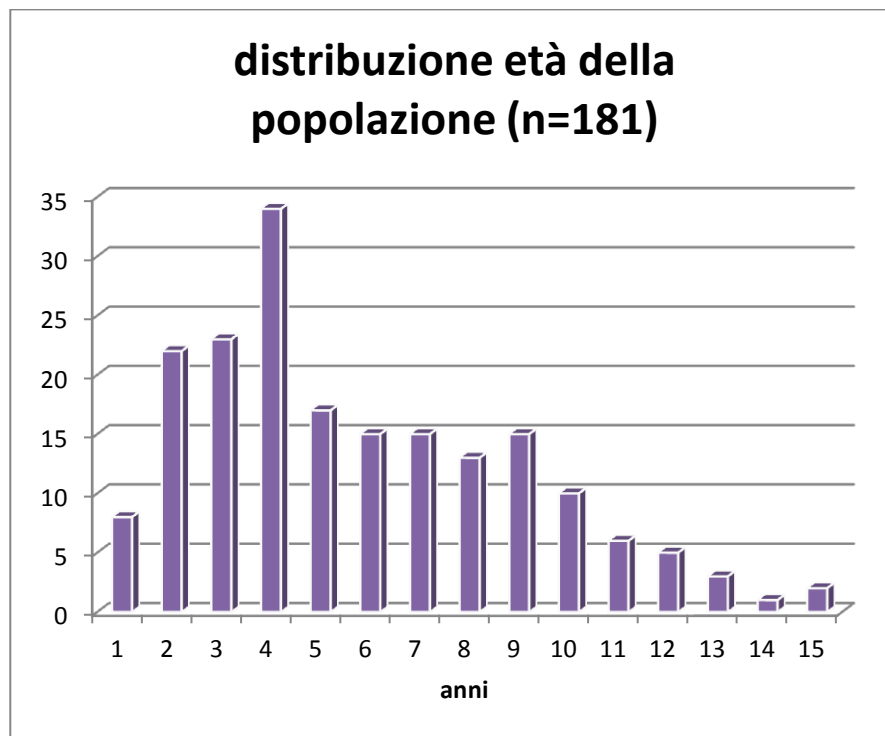


Grafico 2: Distribuzione dell'età nella popolazione di studio. L'istogramma mostra la distribuzione dell'età nella popolazione di studio composta da 181 soggetti.

Dei casi selezionati, 119/181 erano maschi di cui 6 castrati; 62/181 erano femmine di cui 15 sterilizzate. La distribuzione del sesso è rappresentata nel grafico 3.

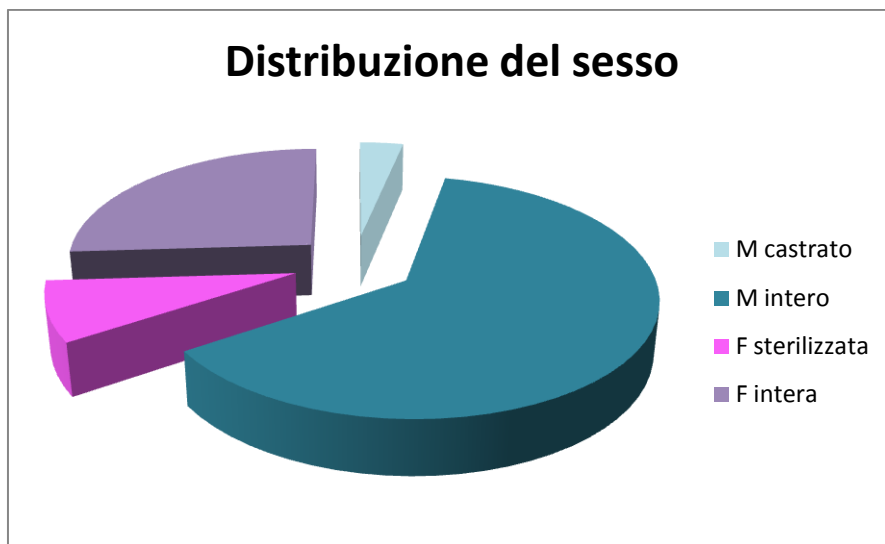


Grafico 3: Distribuzione percentuale del sesso.

Dei casi selezionati la maggior parte erano meticci (87/181, 48%), mentre il resto dei pazienti erano di razza ed in particolare Setter inglese, Boxer, Doberman pinscher, Labrador retriever, Yorkshire terrier, American staffordshire terrier erano le razze più rappresentate con frequenze variabili dal 3 al 5%. La distribuzione delle razze è rappresentata nel **Grafico 4**.

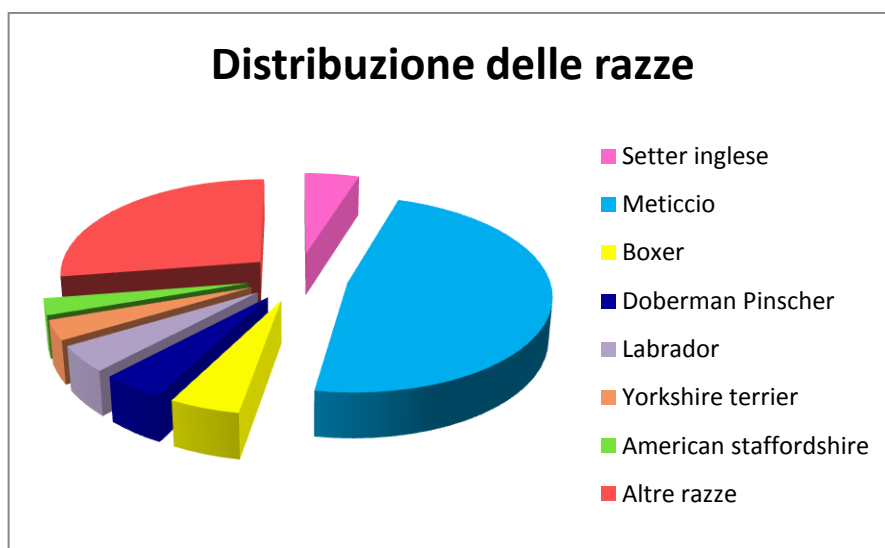


Grafico 4: Distribuzione percentuale delle razze.

3.3. Risultati dei segni clinici

La frequenza dei segni clinici presenti nella popolazione di cani affetti da leishmaniosi è riportata nel grafico 5. I segni clinici riscontrati nella popolazione oggetto di studio sono stati: segni clinici riferibili a dermatopatia (48%), linfoadenomegalia (33,1%), poliuria/polidipsia (Pu/Pd) (20,9%), mucose pallide (17,6 %), segni gastroenterici (vomito o diarrea) (16,5%), dimagrimento (13,8), astenia/debolezza (13,2 %), zoppia (11,6 %), anoressia (10,4%), segni oculari (4,9%), epato-splenomegalia (3,3%), epistassi (3,8) ulcere mucosali (1,6%), onicogrifosi (0,5%). Sette soggetti, inoltre, si presentavano asintomatici (3,8 %).

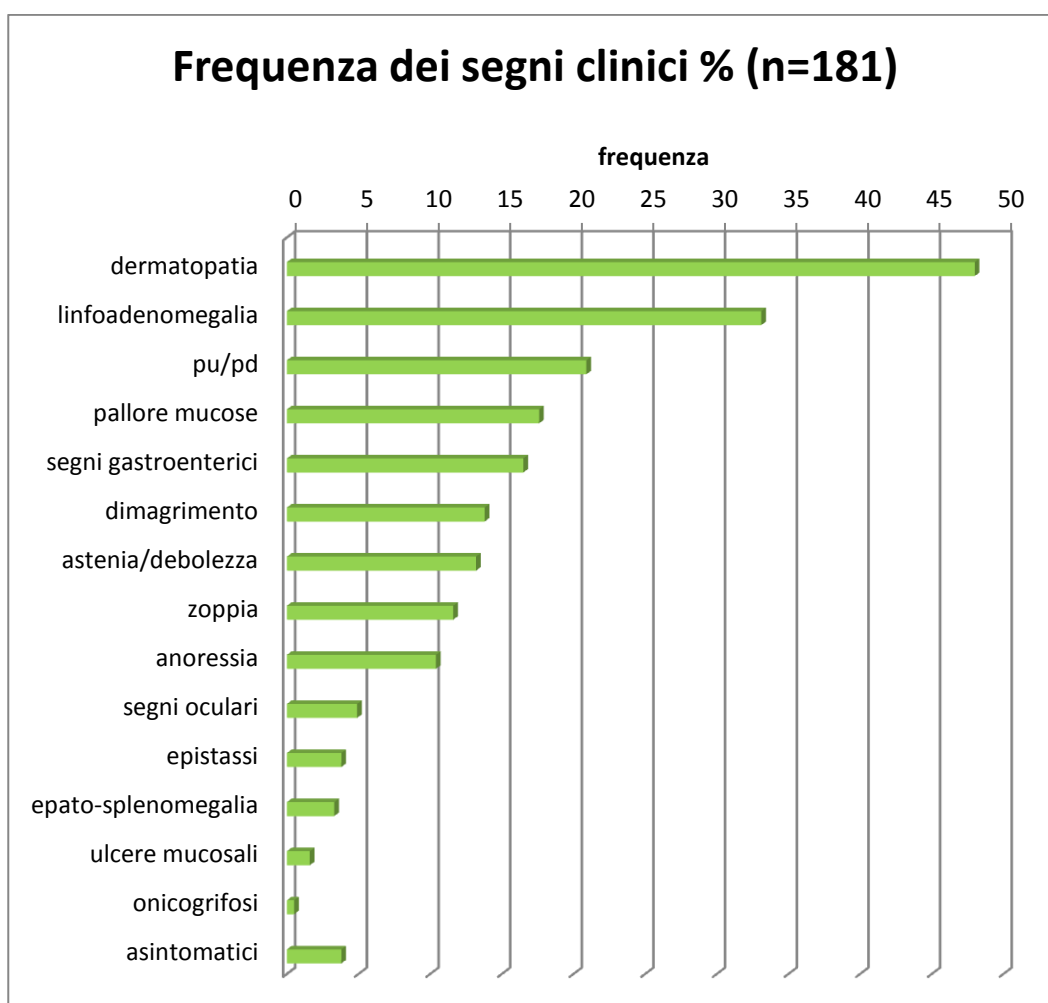


Grafico 5. Frequenza percentuale dei segni clinici.

3.4. Distribuzione dati clinico patologici

I risultati delle indagini clinicopatologiche effettuate sono esposti come statistica descrittiva nelle seguenti tabelle che riportano il numero di casi testati, i valori medi, mediani, minimo e massimo e gli intervalli di riferimento per le singole variabili.

Parametro	N° di soggetti	Media	Mediana	Min-Max	Intervallo di riferimento
Hct (%)	171	35,1	35,4	8,8-57,4	37,0-55,0
Hgb (gr%)	171	12,2	12,4	3,3-19,8	12-18
RBC (mm ³)	171	5317000	5420000	1160000-8600000	5500000-8500000
MCV (fL)	171	65,2	66,2	20,5-83,2	60,0-77,0
MCHC (%)	171	34,9	35,1	28,3-39,8	32,0-38,0
WBC (mm ³)	171	11.555	10.500	1.100-50.000	6000-17000
PLT (mm ³)	171	245000	215500	3230-742000	160000-500000

Tabella 1: Risultati di alcuni parametri selezionati dall'esame emocromocitometrico. Hct = valore ematocrito; Hgb = emoglobina totale; RBC = eritrociti totali; MCV = volume corpuscolare medio; MCHC = concentrazione emoglobinica corpuscolare media; WBC = leucociti totali; PLT = piastrine totali.

Parametro	N° di soggetti	Media	Mediana	Min-Max	Intervallo di riferimento
ALT (U/L)	172	64	36	3-1006	20-55
AST (U/L)	172	62	42	16-595	20-42
BIL (mg/dl)	154	0,29	0,19	0,01-7,07	0,07-0,34
PT(g/dl)	172	7,96	7,46	3,9-15,2	5,60-7,90
ALB (g/dl)	172	2,35	2,34	0,85-3,6	2,80-3,70
A/G	172	0,51	0,46	0,07-1,29	0,6-1,30
γGLOBULINE	74	3,3	2,4	0,2-10,4	0,42-0,78
FE (μg/dl)	97	90	81	27-253	72-285
TIBC (μg/dl)	97	275	273	101-513	281-452
SATURAZIONE(%)	97	34	31	8-80	26-75
CREA (mg/dl)	172	1,80	0,97	0,4-26,3	0,65-1,35
UREA (mg/dl)	168	80	35	11-831	18-55
P (mEQ/dl)	152	5,83	4,2	1,8-37,7	2,6-4,90
Na(mEQ/dl)	169	144	145	135-162	143-154
K (mEQ/dl)	169	4,6	4,5	3,4-8,8	3,9-5,3
Ca(mg/dl)	150	9,8	9,9	4,5-12,7	9,0-11,8
COL (mg/dl)	155	229	216	84-676	140-350
FIB (g/l)	40	4,39	4,17	0,57-8,98	1,45-3,8
CRP (mg/dl)	31	5,57	5,09	0,01-27,06	0-0,5
D-D (μg/ml)	51	1,23	0,28	0,01-34,61	0-0,25
ATIII (%)	49	89	86	41-148	105-166

Tabella 2: Risultati di parametri selezionati dal profilo biochimico e coagulativo comprendenti proteine di fase acuta. ALT = alanina amino transferasi; AST= aspartato amino transferasi; BIL= bilirubina totale; PT= proteine totali; ALB= albumine; A/G= rapporto albumine/globuline; FE= ferro totale; TIBC= total iron binding capacity; CREA= creatinina;P= fosforo totale; COL= colesterolo; FIB= fibrinogeno; D-D= d.dimeri; ATIII= antitrombina III; CRP= proteina C reattiva.

Parametri	N° di soggetti	Media	Mediana	Min-Max	Intervalli di riferimento
P.S.	133	1029	1027	1004-1064	>1030
pH	133	6,3	6	5-9	5,5-6,5
uPT stick	134	/	30	0-500	assente
UPC	110	3,98	1,14	0-29,93	<0,4
UAC	91	1,303	0,123	0,001-13,674	<0,024

Tabella 3: Risultati di parametri selezionati dall'analisi urinaria. P.S.=peso specifico urinario; uPT stick=proteine urinarie misurate tramite dipstick; UPC=rappporto proteine urinarie/creatinina urinaria; UAC= rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria.

Di seguito sono riportati grafici di statistica descrittiva di alcuni parametri clinicopatologici selezionati ed una tabella che descrive la frequenza delle alterazioni clinicopatologiche rilevate nel totale dei pazienti.

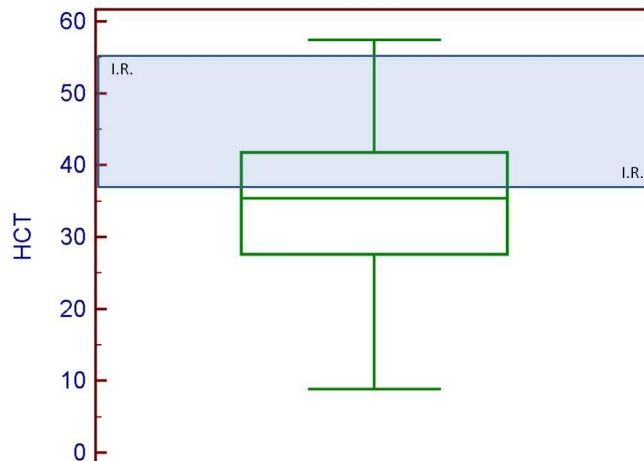


Grafico 6. Distribuzione dei valori di ematocrito. Il grafico descrive la distribuzione dei valori di Hct nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.)

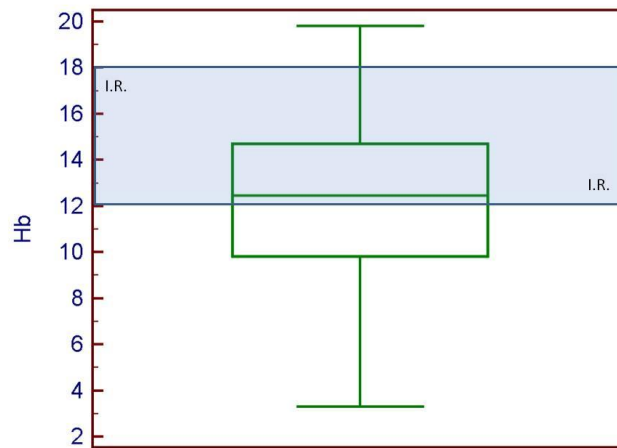


Grafico 7. Distribuzione della concentrazione di emoglobina. Il grafico descrive la distribuzione dei valori di Hb nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

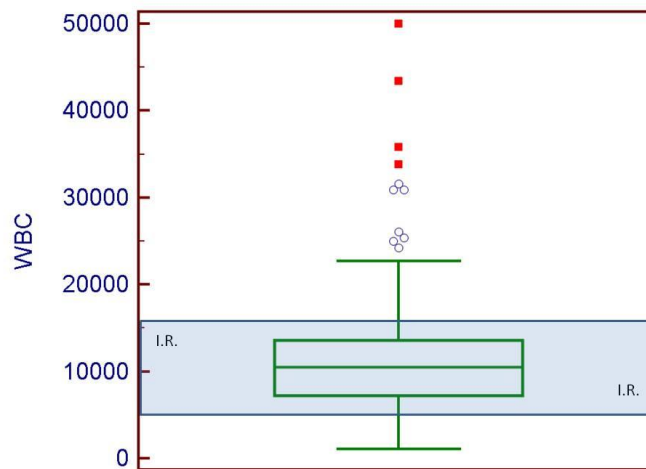


Grafico 8. Distribuzione dei valori di leucociti totali. Il grafico descrive la distribuzione dei valori di WBC nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

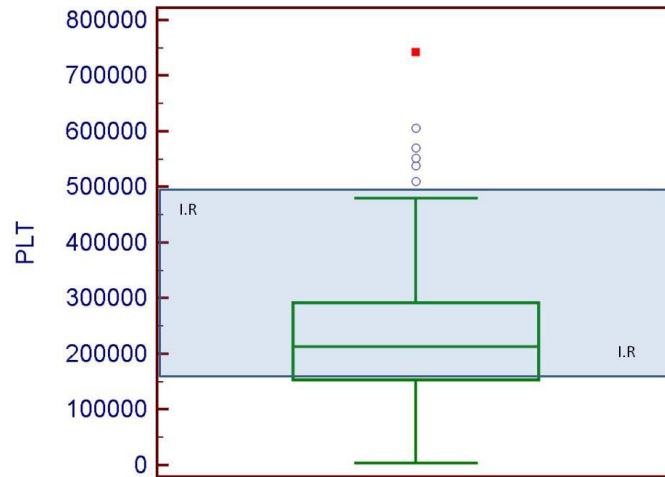


Grafico 9. Distribuzione della conta piastrinica. Il grafico descrive la distribuzione dei valori di PLT nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.)

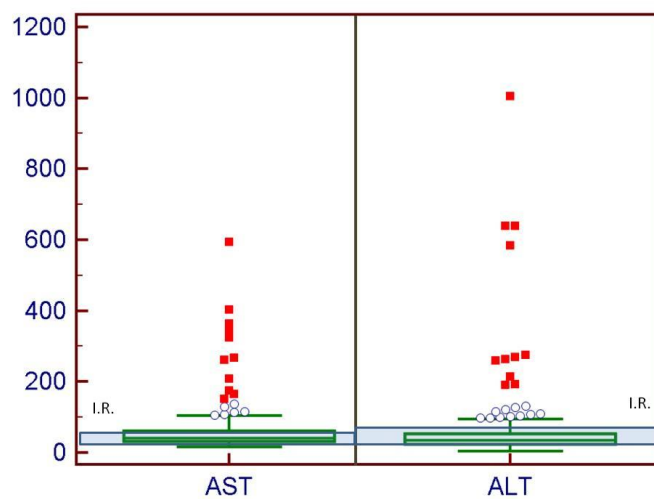


Grafico 10. Distribuzione dei valori delle transaminasi (ALT, AST). Il grafico descrive la distribuzione dei valori di ALT e AST nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

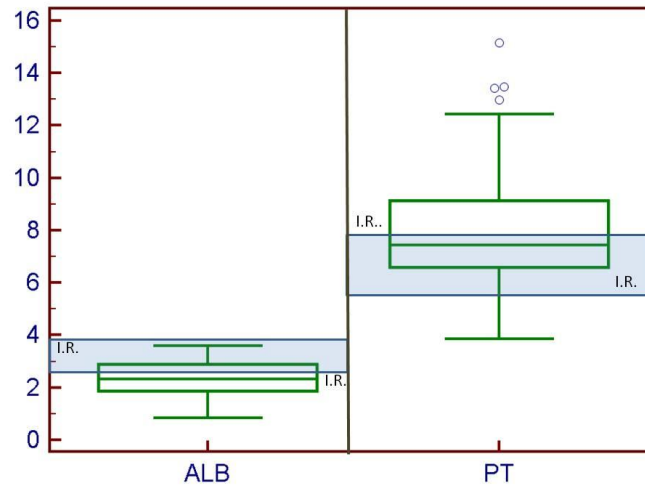


Grafico 11. Distribuzione dei valori di albumine e proteine totali. Il grafico descrive la distribuzione dei valori di albumine (ALB) e proteine totali (PT) nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

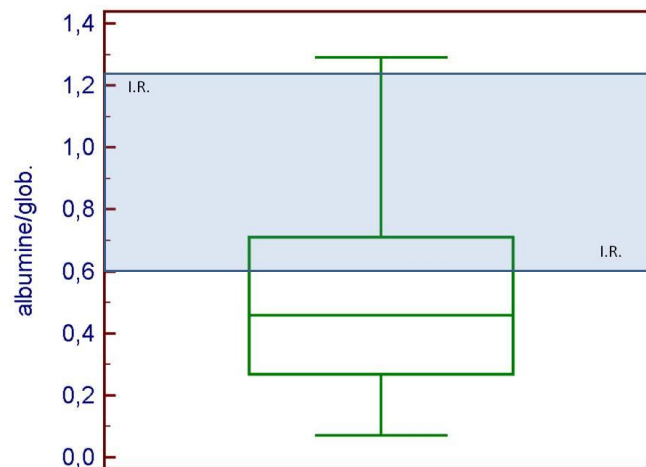


Grafico 12. Distribuzione dei valori del rapporto A/G. Il grafico mostra la distribuzione dei valori del rapporto albumine/globuline (A/G) nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

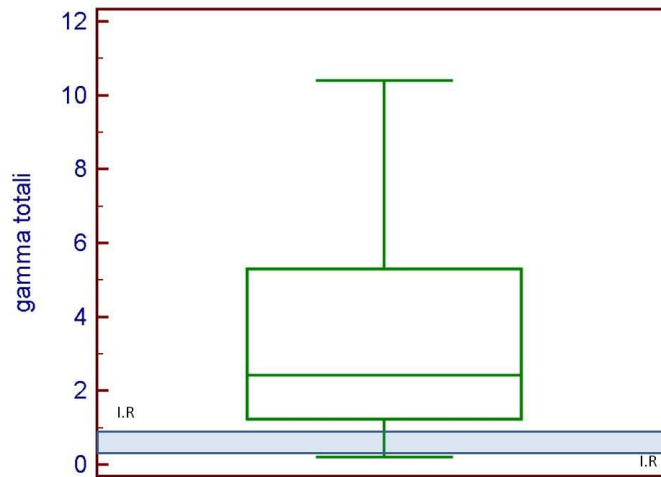


Grafico 13. Distribuzione dei valori di γ globuline totali. Il grafico descrive la distribuzione dei valori di γ globuline totali nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

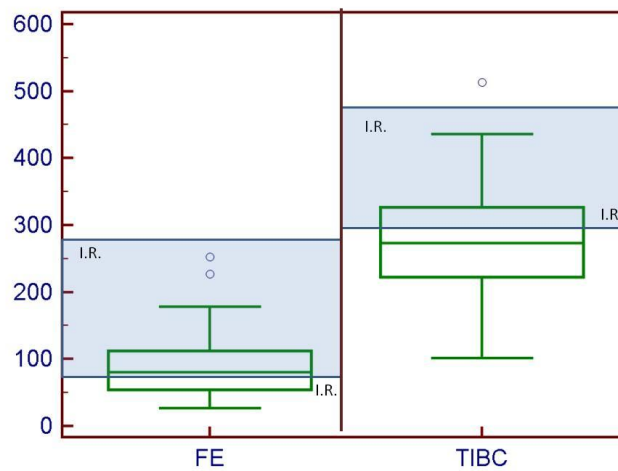


Grafico 14. Distribuzione dei valori di ferro e TIBC. Il grafico descrive la distribuzione del ferro e della TIBC nei soggetti KD. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

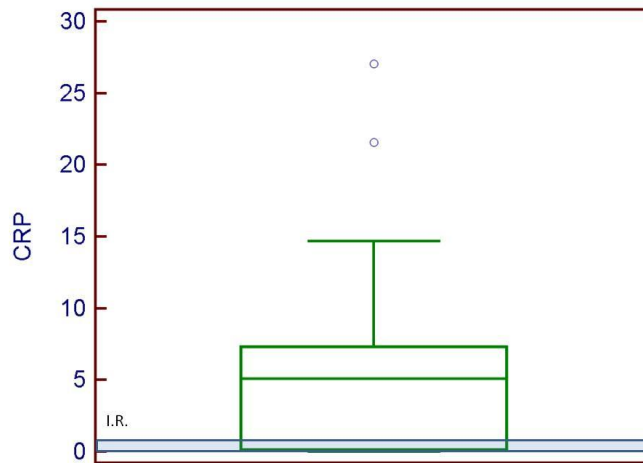


Grafico 15. Distribuzione dei valori di CRP. Il grafico descrive la distribuzione della proteina C reattiva(CRP) nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

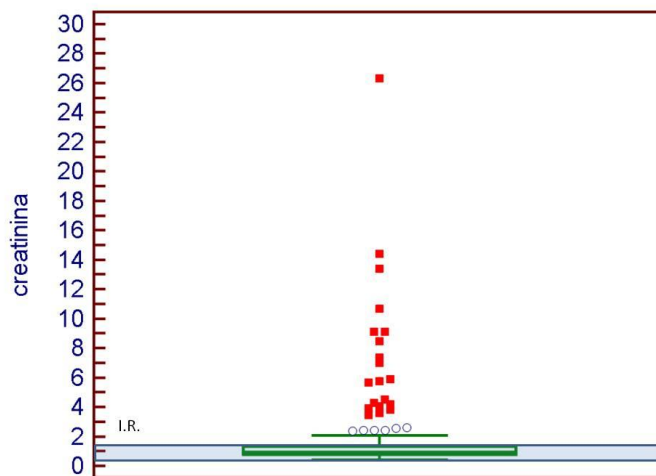


Grafico 16. Distribuzione della concentrazione di creatinina sierica. Il grafico descrive la distribuzione della concentrazione di creatinina sierica nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

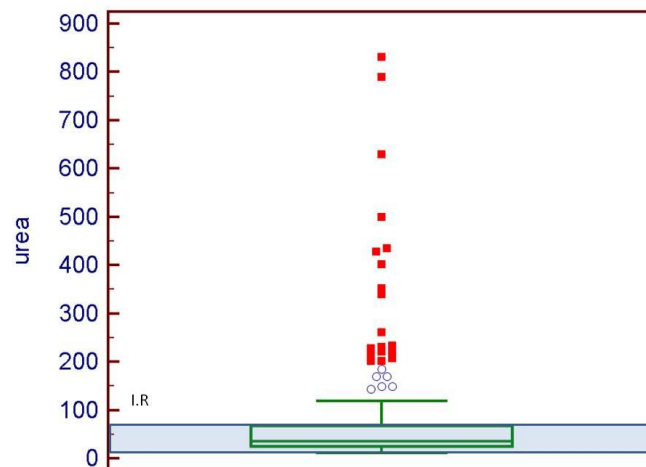


Grafico 17. Distribuzione dei valori di urea sierica. Il grafico descrive la distribuzione di urea sierica nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

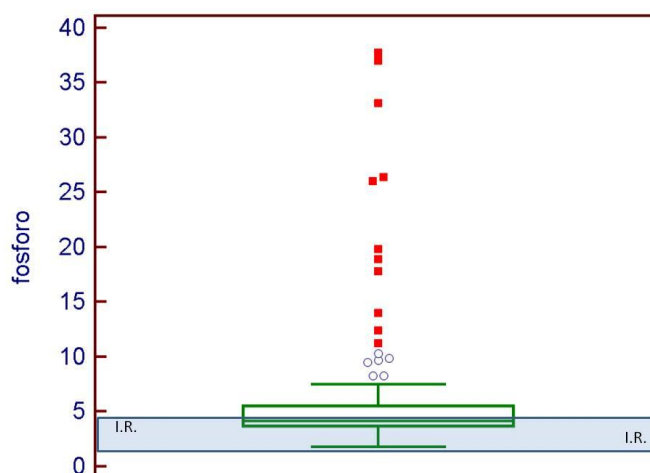


Grafico 18. Distribuzione dei valori di fosforo. Il grafico descrive la distribuzione dei valori di fosforo sierico nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

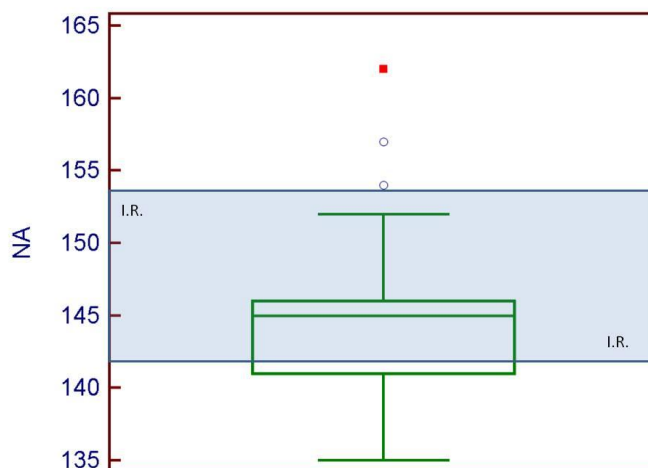


Grafico 19. Distribuzione dei valori di Na. Il grafico descrive la distribuzione dei valori di sodio nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

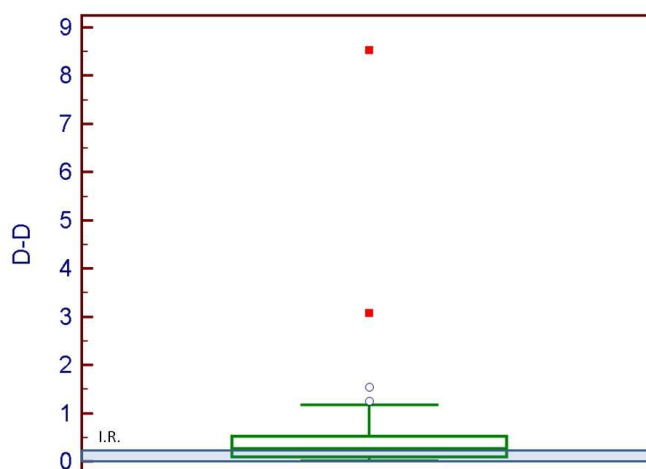


Grafico 20. Distribuzione della concentrazione di D-Dimeri. Il grafico descrive la distribuzione della concentrazione di D-dimeri nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

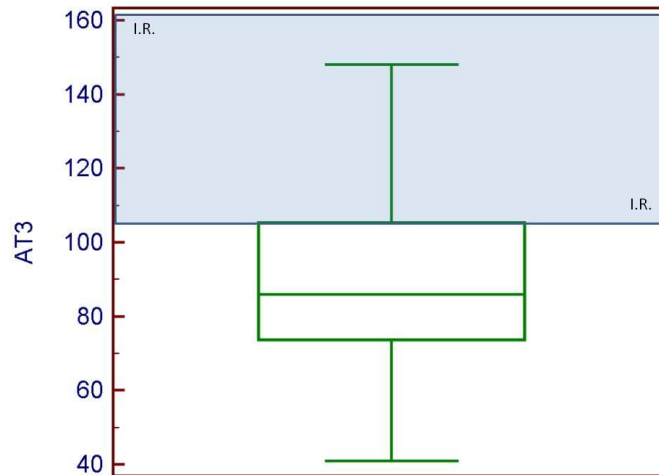


Grafico 21. Distribuzione della concentrazione di antitrombina III. Il grafico rappresenta la distribuzione della concentrazione di antitrombina III nella popolazione di studio. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

In analogia con quanto riportato per i principali segni clinici, è stata stimata la frequenza delle principali e più importanti alterazioni clinicopatologiche rilevate nella popolazione di cani affetti da leishmaniosi. Tali dati sono riportati nella seguente tabella e nel seguente grafico (tabella 15 e grafico 22)

Parametro	N° casi < I.R. (%)	N° casi WRI (%)	N° casi > I.R.(%)	N° di soggetti
Hct	95 (55,6)	74 (43,3)	2 (1,1)	171
Hgb	80 (46,8)	80 (46,8)	10 (6,4)	171
RBC	89 (52)	81 (47,4)	1 (0,6)	171
WBC	22 (12,9)	129 (75,4)	20 (11,7)	171
PLT	44 (25,7)	120 (70,2)	6 (4,1)	171
CREA	/	135 (78,5)	37 (21,5)	172
UREA	11 (6,5)	107 (63,7)	50 (29,8)	168
P	/	103 (67,8)	49 (32,2)	152
ALT	/	131 (76,2)	41 (23,8)	172
AST	/	86 (50)	86 (50)	172
BIL	/	145 (94,2)	9 (5,8)	154
COL	16 (10,3)	126 (81,3)	13 (8,4)	155
PT	14 (8,1)	83 (48,2)	75 (43,7)	172
ALB	118 (69,4)	51 (30,6)	/	172
A/G	112 (65,8)	57 (34,2)	/	172
γGLOBULINE	/	11 (14,9)	62 (85,1)	74
FE	39 (40,2)	58 (59,8)	/	97
TIBC	55 (56,7)	42 (43,3)	/	97
Na	54 (32)	112 (66,3)	3 (1,7)	169
K	6 (3,6)	149 (88,2)	14 (8,2)	169
CRP	/	10 (32,3)	21 (67,7)	31
ATIII	34 (69,4)	15 (30,6)	/	49
D-D	/	23 (45,1)	28 (54,9)	51
P.S.	75 (56,4)	58 (43,6)	/	133
uPT stick	/	49 (36,6)	85 (63,4)	134
UPC	/	45 (40,9)	65 (59,1)	110
UAC	/	34 (37,4)	57 (62,6)	91

Tabella 4: Frequenza delle alterazioni dei parametri clinico patologici selezionati. All'interno della parentesi sono riportati i valori percentuali. Hct =valore ematocrito; Hgb=emoglobina totale; RBC=eritrociti totali; MCV =volume corpuscolare medio; MCHC =concentrazione emoglobinica corpuscolare media; WBC=leucociti totali; PLT=piastrine totali; ALT=alanina amino transferasi; AST= aspartato amino transferasi; BIL=bilirubina totale; PT=proteine totali; ALB=albumine; A/G=rappporto albumine/globuline; FE= ferro totale; TIBC=total iron binding capacity; CREA=creatinina;P=fosforo totale; COL=colesterolo; D-D=d.dimeri; ATIII=antitrombina III; CRP=proteina C reattiva; P.S.=peso specifico urinario; uPT stick=proteine urinarie misurate tramite dipstick; UPC=rappporto proteine urinarie/creatinina urinaria; UAC= rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria. I.R.= intervallo di riferimento, WRI=all'interno dell'intervallo di riferimento.

Le alterazioni clinicopatologiche più frequenti nella nostra popolazione sono state l'iperyglobulinemia (85,1%), l'ipoalbuminemia (69,4%), la riduzione dell'attività plasmatica dell'ATIII (69,4%), la riduzione del rapporto A/G (65,8%) e la proteinuria misurata tramite dipstick, UAC e UPC (63,4 %, 62,6 % e 59,1%, rispettivamente).

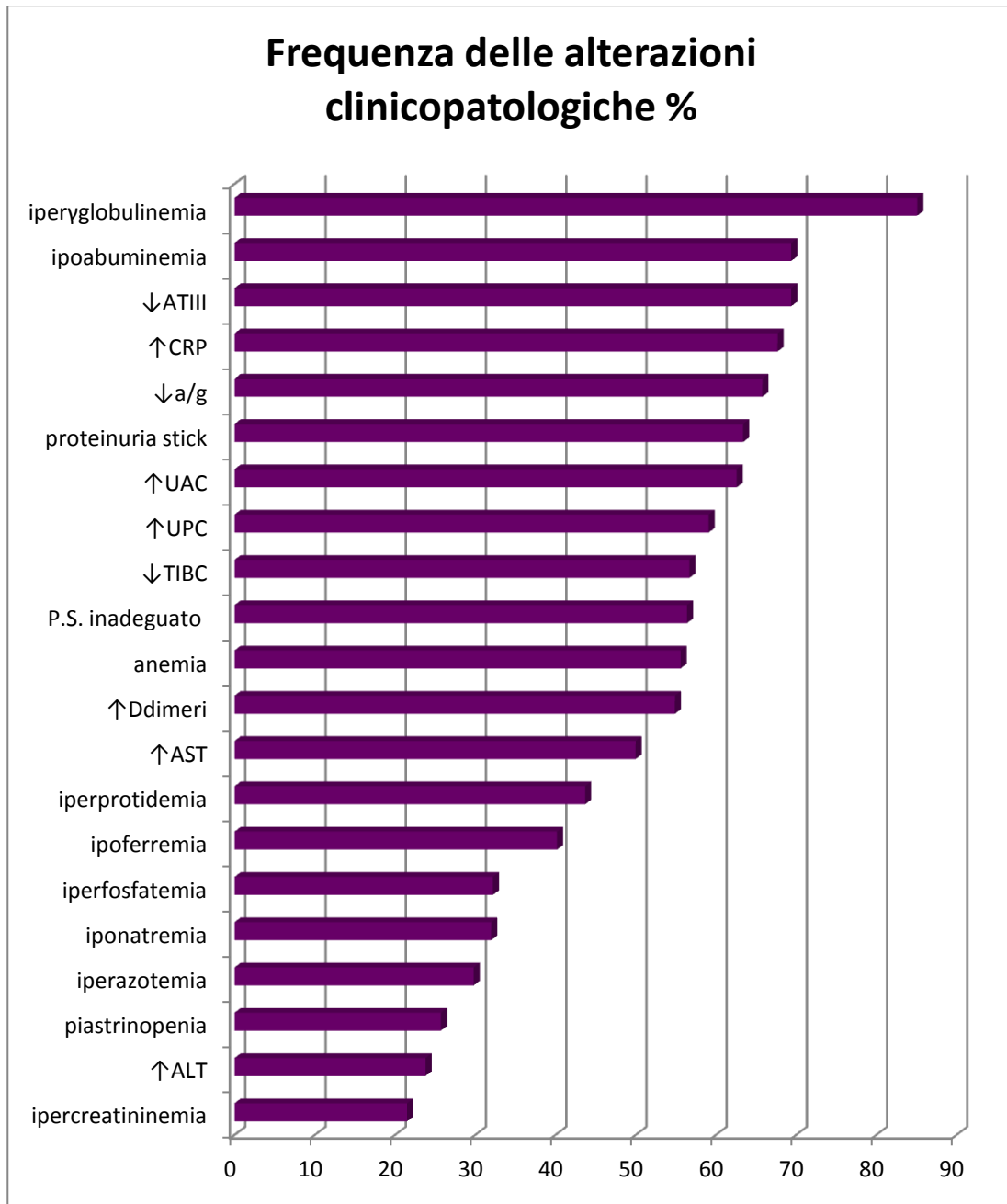


Grafico 22: Frequenza percentuale delle principali alterazioni clinico patologiche rilevate.

Nel grafico sono riportate le alterazioni che sono presenti almeno in un 20 % di casi.

3.5. Risultati dei pazienti affetti da patologia renale (KD)

L'età dei soggetti appartenenti al gruppo KD variava da 12 mesi a 154 mesi (1-14 anni). La mediana era di 64 mesi (5 anni). La distribuzione dell'età nei soggetti del gruppo KD è riportata nel grafico 23 mentre nel grafico 24 la distribuzione dell'età nei soggetti KD è stata confrontata con quella dei soggetti non KD.

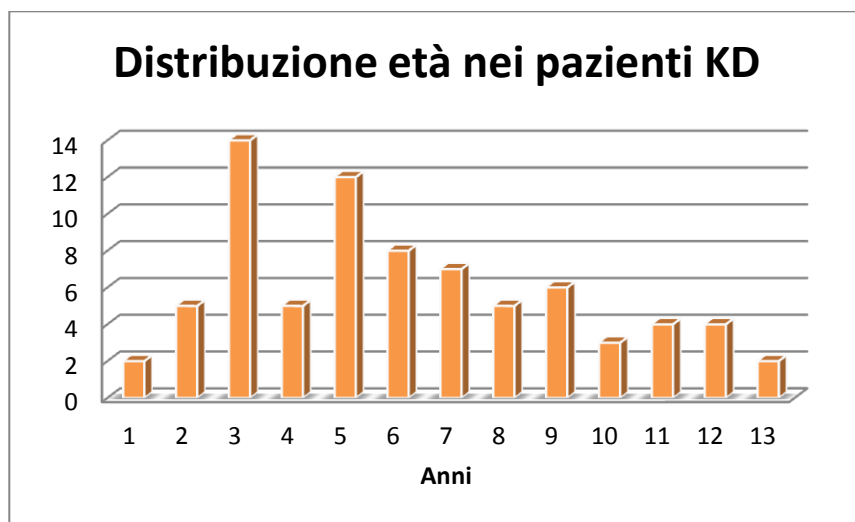


Grafico 23: Distribuzione dell'età nei pazienti KD. L'istogramma riporta la distribuzione dell'età (anni) nei soggetti nefropatici.

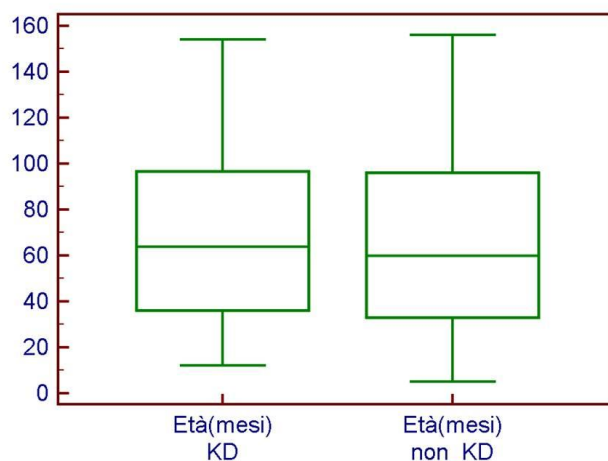


Grafico 24. Distribuzione dell'età nei soggetti KD e nei soggetti non KD. Il grafico non mostra nessuna differenza significativa tra la distribuzione dell'età nei soggetti KD e la distribuzione dell'età nei soggetti non KD.

Nei grafici che seguono sono riportati, attraverso *box-and-whisker*, i risultati descrittivi dei parametri utilizzati per definire e includere i soggetti appartenenti al gruppo KD.

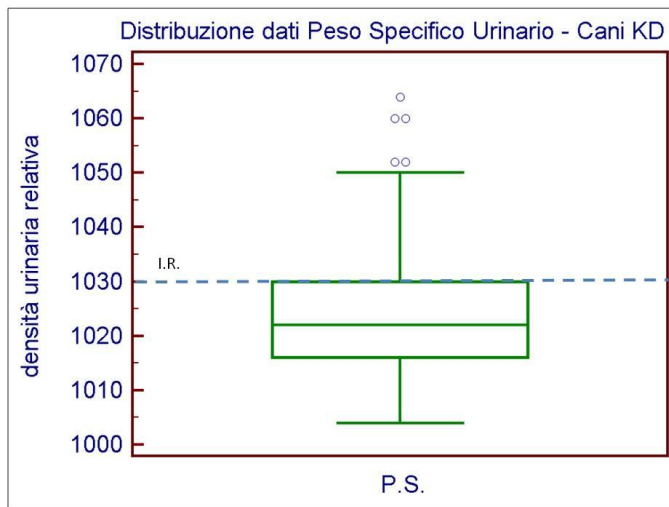


Grafico 25. Distribuzione dei valori di peso specifico urinario nei soggetti KD. Il grafico mostra la distribuzione dei valori di peso specifico urinario nei soggetti KD. La linea azzurra tratteggiata indica l'intervallo di riferimento (I.R.) inteso come valore soglia di concentrazione "adeguata" dell'urina di cane in riferimento alla funzionalità renale.

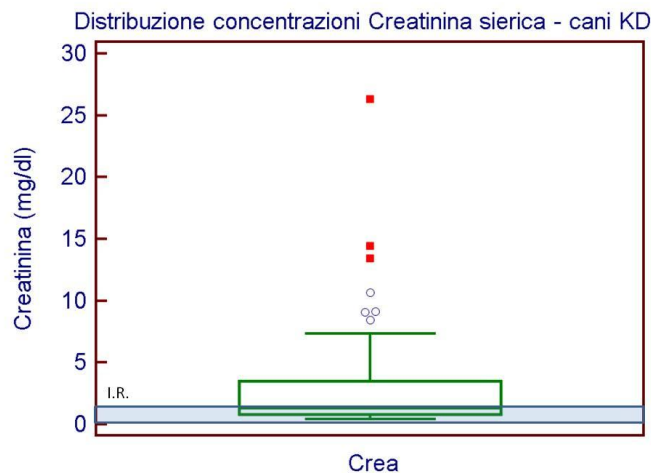


Grafico 26. Distribuzione dei valori di creatinina sierica. Il grafico mostra la distribuzione della concentrazione di creatinina sierica nei soggetti KD. Le linee azzurre rappresentano il limite superiore e inferiore dell'intervallo di riferimento (I.R.).

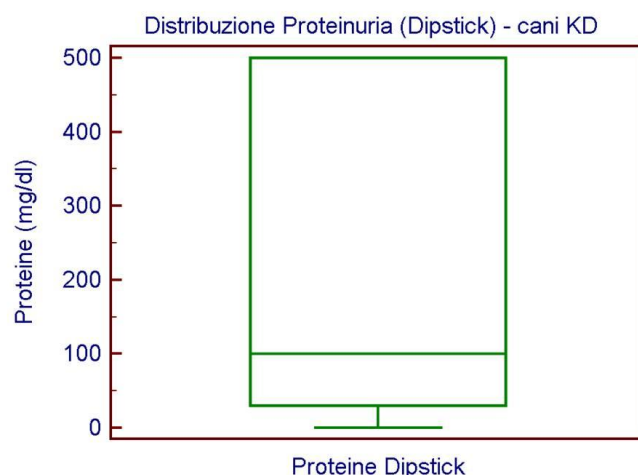


Grafico 27. Distribuzione dei valori di proteinuria(disptick). Il grafico mostra la distribuzione dei valori di proteinuria misurata tramite disptick urinario nei soggetti KD (si ricorda che il disptick urinario è una metodica semiquantitativa che rileva concentrazione di proteine pari a 0, 30, 100, 500 mg/dl).

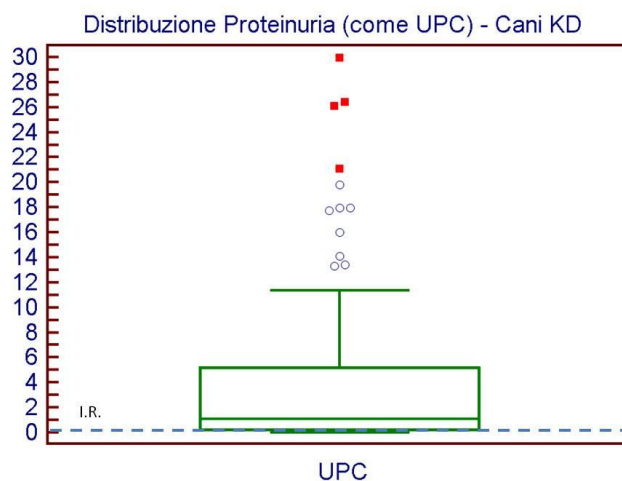


Grafico 28. Distribuzione dei valori di proteinuria (UPC). Il grafico mostra la distribuzione dei valori di proteinuria, valutata tramite il rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC) nei soggetti KD. La linea azzurra tratteggiata rappresenta l'intervallo di riferimento (I.R.) utilizzato (UPC<0,4).

Il confronto tra i risultati dei parametri clinicopatologici misurati nei soggetti del gruppo KD e nei soggetti non appartenenti al gruppo KD è raffigurato attraverso i seguenti grafici *box-and-whiskers* e tali dati sono riassunti nella tabella 16. Di seguito sono riportati i grafici dei parametri per i quali è stata rilevata una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra i due gruppi di soggetti.

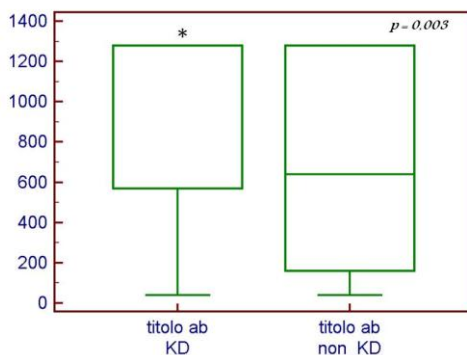


Grafico 29. Confronto del titolo anticorpale tra i soggetti KD e i soggetti non KD.

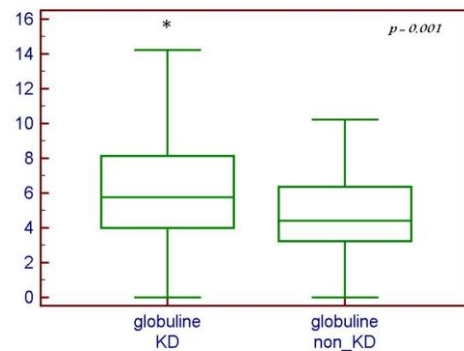


Grafico 30. Confronto dei valori di globuline tra soggetti KD e soggetti non KD.

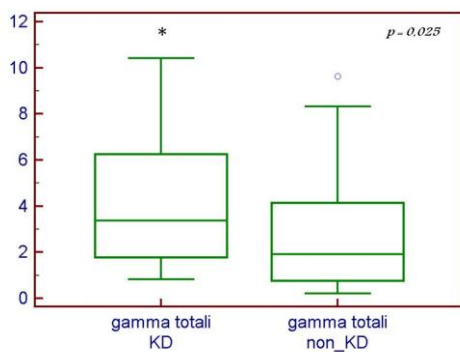


Grafico 31. Confronto tra valori di γ globuline totali tra soggetti KD e soggetti non KD

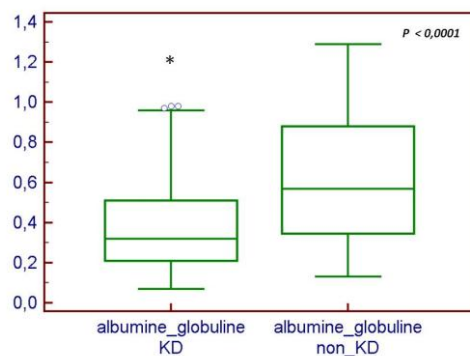


Grafico 32. Confronto del rapporto A/G nei soggetti KD e non KD.

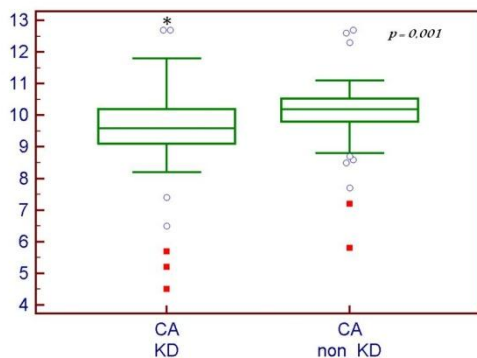


Grafico 33. Confronto dei valori di Hct tra soggetti KD e non KD

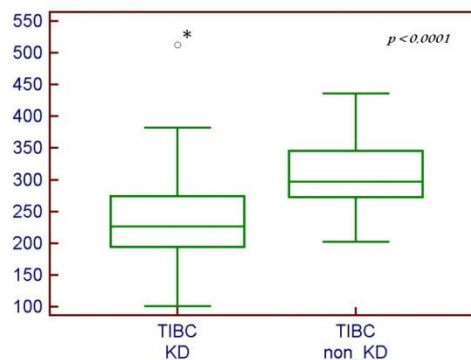


Grafico 34. Confronto tra i valori di TIBC tra soggetti KD e non KD.

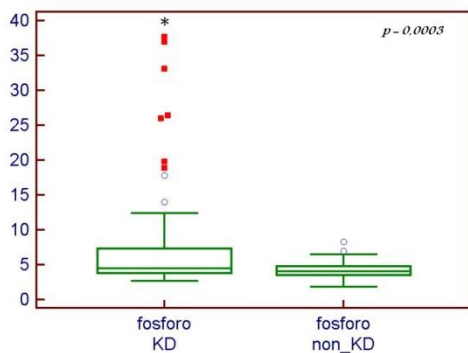


Grafico 35. Confronto tra i valori di fosforo nei soggetti KD e non KD.

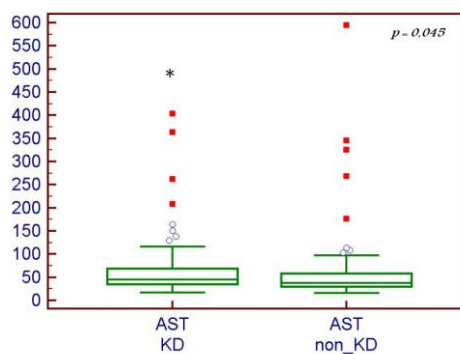


Grafico 36. Confronto tra i valori di AST nei soggetti KD e non KD.

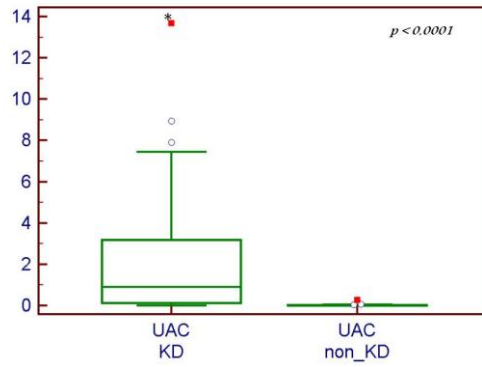


Grafico 37. Confronto tra i valori di albuminuria misurata con il rapporto UAC dei soggetti KD e non KD.

Parametro	Mediana KD	Mediana non KD	p
Titolo anticorpale	1:1280	1:640	0,0036*
Proteine totali (mg/dl)	7,52	7,45	0,274
Albumine (g/dl)	2,01	2,69	<0,0001*
A/G	0,3	0,57	<0,0001*
Globuline (g/dl)	5,7	4,4	0,0014*
γglobuline (g/dl)	3,3	1,9	0,0249*
Ematocrito (%)	30,4	39,2	<0,0001*
TIBC (μg/dl)	227	298	<0,0001*
Urea(mg/dl)	70	29	<0,0001*
Fosforo(mg/dl)	4,5	4,1	0,0003*
AST (U/l)	45	38	0,045*
Calcio (mg/dl)	9,6	12,2	0,001*
ATIII (%)	82	106	0,001*
Proteinuria stick (mg/dl)	100	0	<0,0001*
UAC	0,91	0,005	<0,0001*

Tabella 5: Confronto tra i risultati dei parametri clinico patologici nei soggetti KD e non KD.

I risultati del confronto dei parametri clinicopatologici tra pazienti KD e non KD evidenziano importanti differenze quali-quantitative nelle proteine plasmatiche tra i due gruppi. Nel dettaglio, i pazienti KD presentano un aumento significativo delle concentrazioni di globuline e in modo particolare delle γglobuline (e del titolo anticorpale) associato ad una riduzione delle concentrazioni di albumine e del rapporto A/G. La riduzione significativa delle albumine si accompagna ad un decremento di TIBC e ATIII.

In analogia con i criteri d'inclusione di tali pazienti, le concentrazioni plasmatiche di urea e fosforo si presentano significativamente più elevate nel gruppo KD, così come la proteinuria al disstick e il rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria (UAC).

3.6. Risultati dei pazienti "anemici" e "non anemici"

Il confronto tra i risultati dei parametri clinico patologici misurati nei soggetti anemici (cut-off Hct fissato al 37%) e non anemici è descritto nei grafici a *box-and-whiskers* e i dati sono riportati nella tabella 17 . Di seguito, in analogia con i gruppi dei nefropatici/non nefropatici, sono raffigurati i grafici dei parametri per i quali è stata rilevata una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra i due gruppi di soggetti.

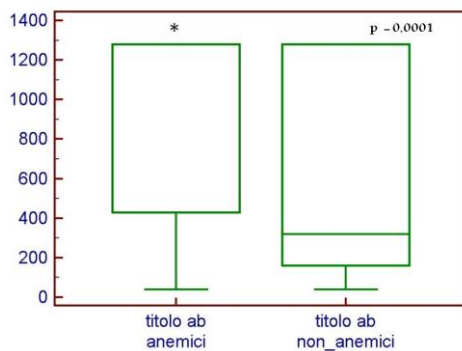


Grafico 38. Confronto del titolo anticorpale tra soggetti anemici e non anemici.

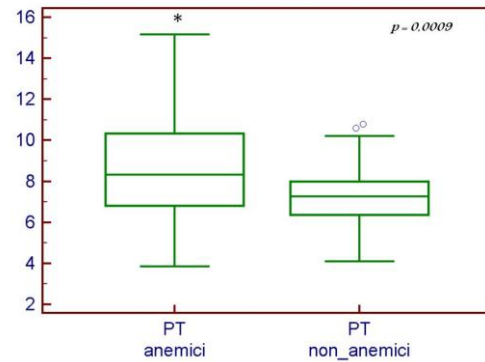


Grafico 39. Confronto del valore di proteine totali tra soggetti anemici e non anemici.

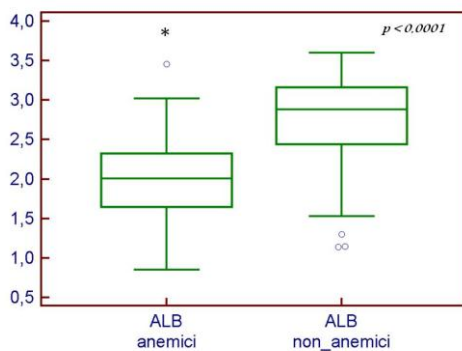


Grafico 40. Confronto tra il valore di albumine in soggetti anemici e non anemici

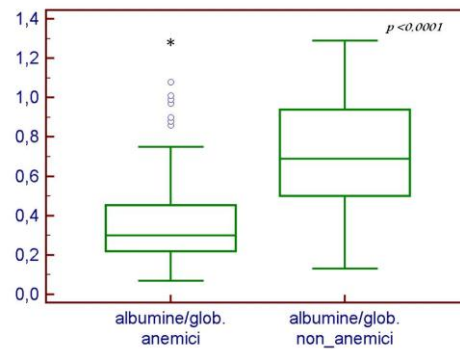


Grafico 41. Confronto del rapporto albumine/globuline tra soggetti anemici e non anemici.

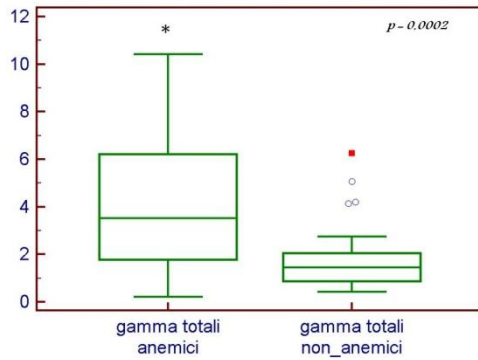


Grafico 44. Confronto tra i valori di gamma globuline nei soggetti anemici e non anemici.

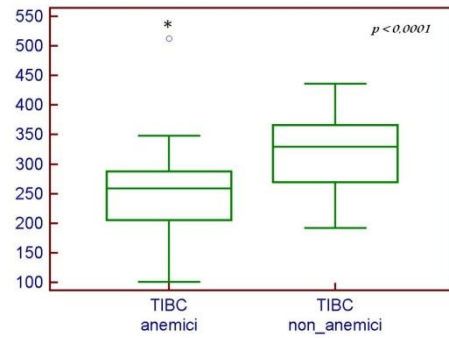


Grafico 43. Confronto tra i valori di TIBC nei soggetti anemici e non anemici.

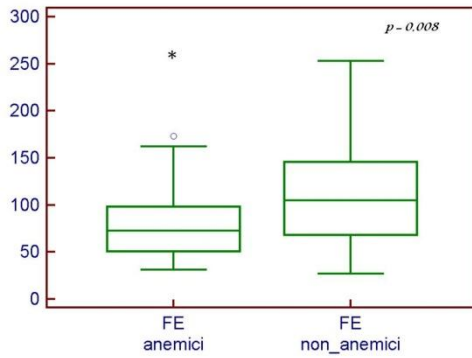


Grafico 44. Confronto tra i valori di ferro sierico in soggetti anemici e non anemici.

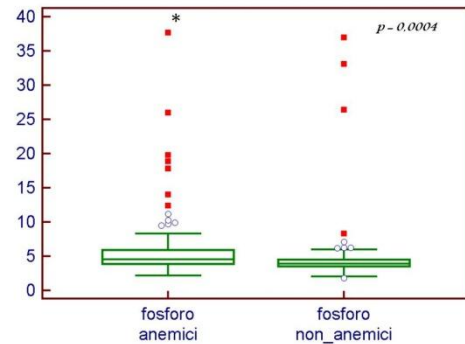


Grafico 45. Confronto tra le concentrazioni di fosforo in soggetti anemici e non anemici

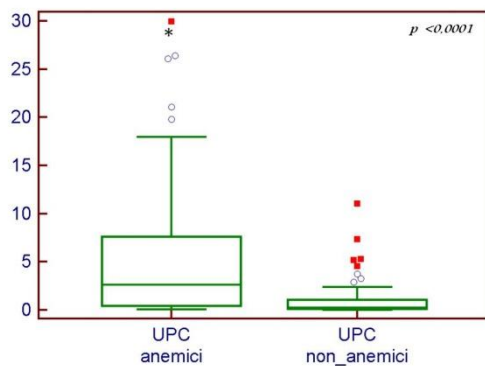


Grafico 46. Confronto dei valori di UPC in soggetti anemici e non anemici.

Parametro	Mediana anemici	Mediana non anemici	p
Titolo anticorpali	1:1280	1:320	0,0001*
Proteine totali (mg/dl)	8,34	7,29	0,0009*
Albumine (g/dl)	2,01	2,89	<0,0001*
A/G	0,30	0,6	<0,0001*
Globuline (g/dl)	6,24	1,45	<0,0001*
γ globuline (g/dl)	3,54	1,45	0,0002*
Ferro (μ g/dl)	73	105	0,008
TIBC (μ g/dl)	260	330	<0,0001*
Creatinina (mg/dl)	0,93	0,98	0,34
Fosforo(mg/dl)	4,60	3,96	0,0004*
AST (U/l)	45	39	0,04*
CRP (mg/dl)	5,35	1,40	0,28
ATIII (%)	85	103	0,0042*
UAC	0,47	0,013	<0,0001*
UPC	2,62	0,28	<0,0001*

Tabella 6: Confronto tra i risultati dei parametri clinico-patologici di soggetti anemici e non anemici.

Il risultati del confronto dei parametri clinicopatologici tra i due gruppi mostra che i soggetti anemici presentano titoli anticorpali più elevati associati ad un aumento della protidemia. Tale aumento è sostenuto dall'aumento delle globuline ed in particolare delle γ -globuline. Inoltre, lo stesso si accompagna ad una riduzione significativa del rapporto A/G e della concentrazione di albumine. I soggetti anemici presentano inoltre una riduzione significativa della concentrazione di Ferro totale, TIBC e ATIII.

Per quanto riguarda i parametri "renali", sono state riscontrate differenze significative nelle concentrazioni di Fosforo, nell'albuminuria (UAC) e nella proteinuria (UPC). Tali valori sono risultati più elevati nei soggetti anemici.

3.7. Correlazioni

Di seguito sono riportati i risultati di alcune correlazioni tra variabili laboratoristiche che si sono rivelate utili ad una migliore comprensione dei processi patogenetici sottostanti ad un determinato rilievo clinicopatologico. In particolare è stata riscontrata una correlazione significativa tra le concentrazioni di albumina sierica e UPC ($r = -0,531$, $p < 0,0001$), TIBC ($r = 0,717$, $p < 0,0001$) ed ematocrito % ($r = 0,622$, $p < 0,0001$). Il valore ematocrito, inoltre, è risultato correlato con le concentrazioni sieriche di Proteine totali ($r = -0,312$, $p < 0,0001$) e Globuline ($r = -0,457$, $p < 0,0001$).

3.8 Risultati misurazioni Immunoglobuline G e Immunoglobuline M

In 26 di 181 soggetti inclusi nello studio e sottoposti a differenti trattamenti anti-*leishmania* (antimoniato di N-metilglucamina, allopurinolo, miltefosina) sono state misurate le concentrazioni di IgG ed IgM prima dell'inizio del trattamento (ammissione in Ospedale) e durante successivi follow-up entro 30 giorni, a 60-90 giorni, a 90-120 giorni, a 120-150 giorni, a 150-180 giorni e da 180 a 240 giorni dall'inizio della terapia. Nelle seguenti tabelle sono esposte come statistica descrittiva i risultati delle misurazioni che riportano il numero di casi testati, i valori medi, la deviazione standard, i valori mediani, minimo e massimo.

Tempo	Numero casi	Media	Deviazione Standard	Mediana	Minimo	Massimo
Ammissione	26	4608	3231	4105	1069	13797
Entro 30 giorni	9	3982	2875	2767	1368	8978
Da 30 a 60 giorni	13	3312	2322	2723	570	8643
Da 60 a 90 giorni	7	3546	2559	3418	311	6572
Da 90 a 120 giorni	7	2462	1472	1990	1083	4913
Da 120 a 150 giorni	5	2344	1306	2382	302	3568
Da 150 a 180 giorni	8	1914	987	2003	322	3110
Da 180 a 240 giorni	11	1688	804	1503	278	2876

Tabella 8: Risultati delle misurazioni di IgG

Tempo	Numero casi	Media	Deviazione Standard	Mediana	Minimo	Massimo
Ammissione	26	392	194	334	163	978
Entro 30 giorni	9	295	115	293	75	455
Da 30 a 60 giorni	13	405	187	391	225	874
Da 60 a 90 giorni	7	305	113	286	177	459
Da 90 a 120 giorni	7	308	68	286	235	406
Da 120 a 150 giorni	5	218	117	279	52	319
Da 150 a 180 giorni	8	264	94	258	161	456
Da 180 a 240 giorni	11	271	71	269	150	396

Tabella 7: Risultati delle misurazioni di IgM

Il confronto tra i risultati delle concentrazioni di IgG e IgM in soggetti sani ed in soggetti affetti da leishmaniosi sia al momento dell'ammissione sia nel corso di successivi follow-up è raffigurato attraverso i seguenti grafici *box-and-whiskers*.

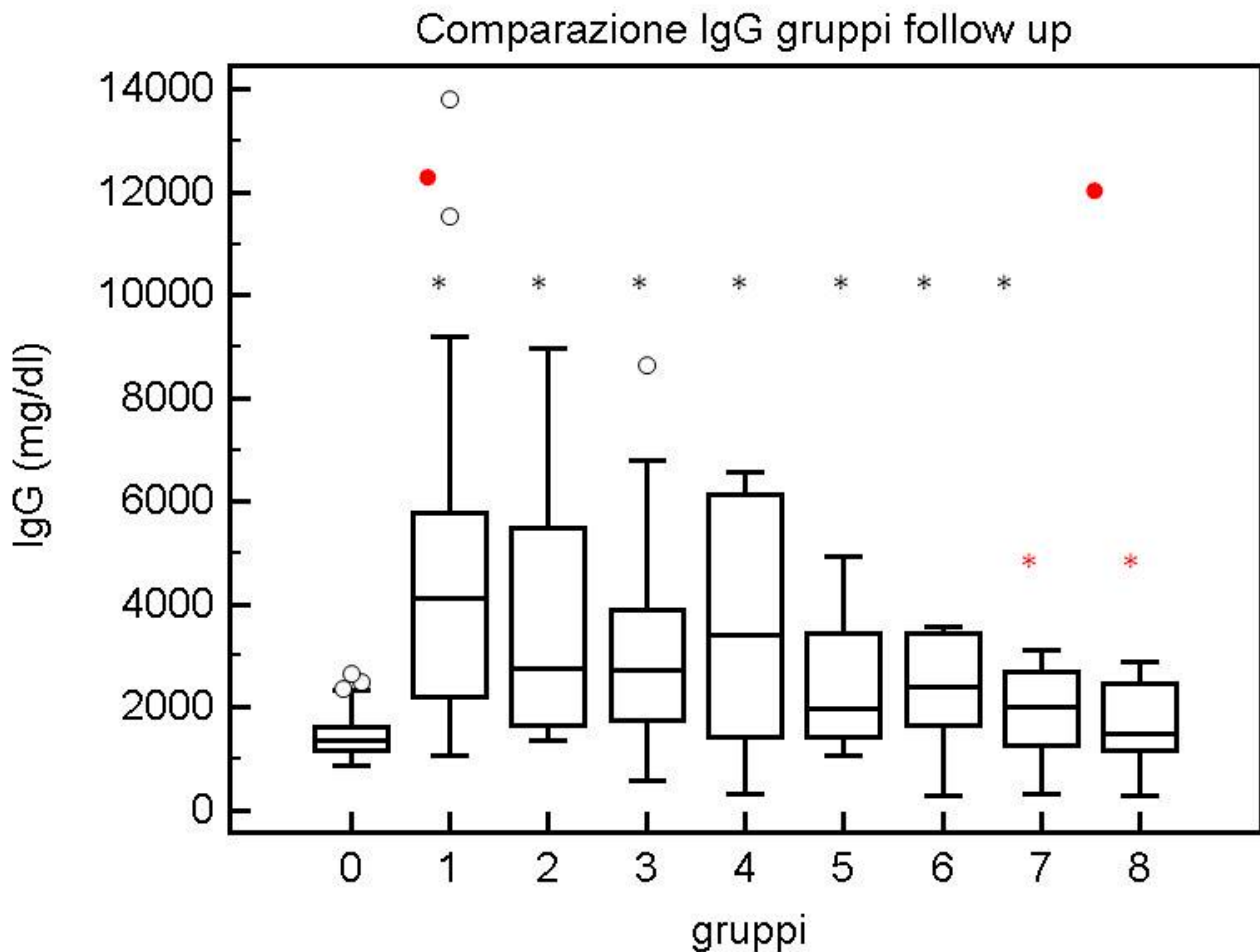


Grafico 53: Comparazione dei valori di IgG tra soggetti sani e soggetti con leishmaniosi all'ammissione e nel follow-up in corso di trattamento. Gruppo 0: soggetti sani; Gruppo 1: soggetti con leishmaniosi al momento dell'ammissione prima del trattamento; Gruppo 2: follow-up entro 30 giorni; Gruppo 3: follow-up a 30-60 giorni; Gruppo 4: follow-up a 60-90 giorni; Gruppo 5: follow-up a 90-120 giorni; Gruppo 6: follow-up a 120-150 giorni; Gruppo 7: a 150-180 giorni; Gruppo 8: follow-up a 180-240 giorni.

La linea all'interno dei *box-and-whiskers* rappresenta il valore mediano di IgG all'interno del gruppo. (*) Il grafico mostra che i soggetti affetti da leishmaniosi hanno concentrazioni di IgG significativamente più elevate rispetto ai soggetti sani fino a 180 giorni dall'inizio del trattamento; (*) i valori di IgG riscontrati nei follow-up a 150-180 (Gruppo 7) ed a 180-240 (Gruppo 8) giorni dall'inizio del trattamento sono risultati significativamente inferiori rispetto alle concentrazioni rilevate al momento dell'ammissione; (●) le concentrazioni di IgG misurate entro 30 giorni sono risultate inoltre significativamente diminuite sia rispetto al gruppo ammissione (Gruppo 1) che rispetto al controllo a 180-240 giorni (Gruppo 8). Le differenze riscontrate risultano altamente significative ($p < 0,0001$).

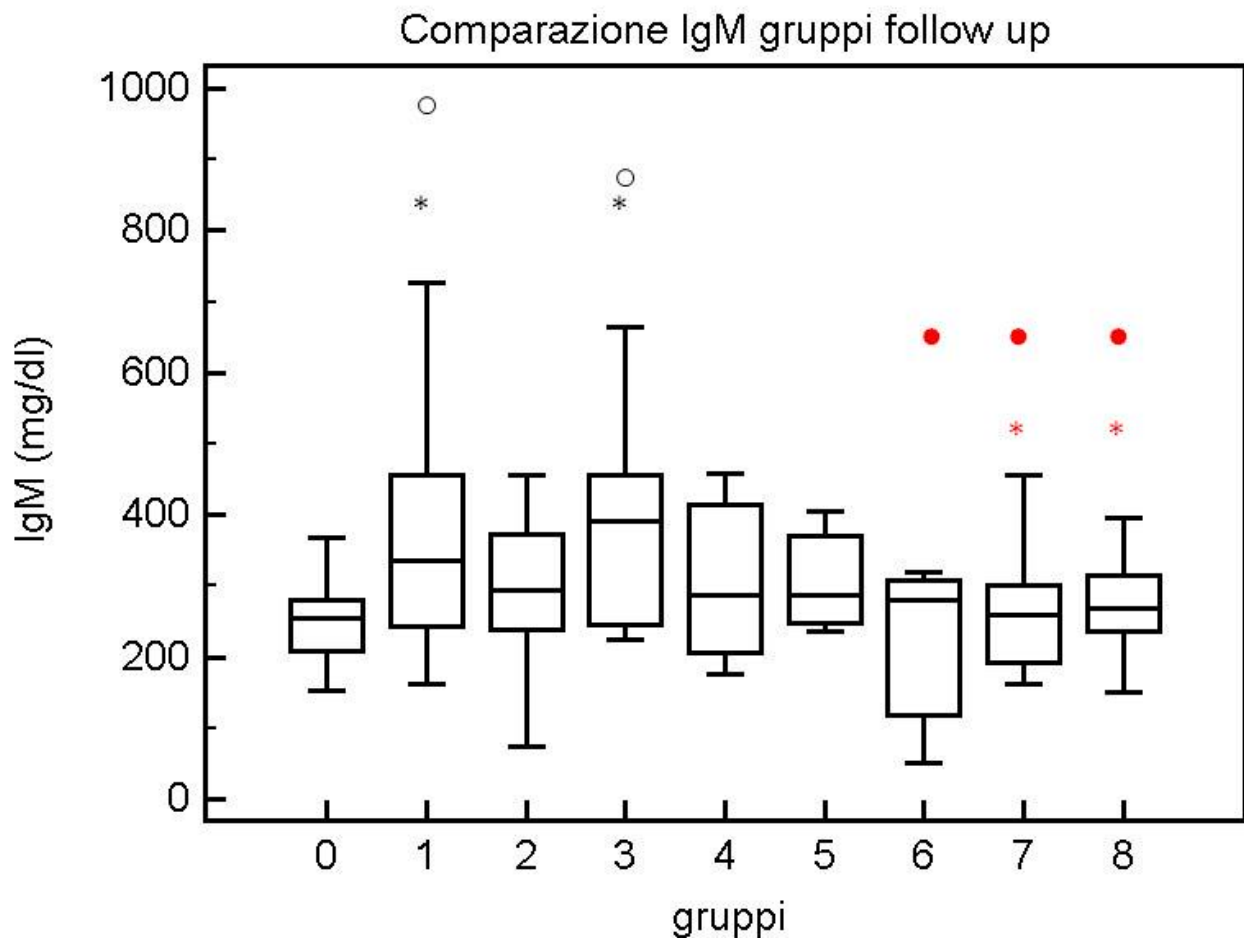


Grafico 54: Comparazione dei valori di IgM tra soggetti sani e soggetti affetti da leishmaniosi all'ammissione e nel follow-up in corso di trattamento. Gruppo 0: soggetti sani; Gruppo 1: soggetti con leishmaniosi al momento dell'ammissione prima del trattamento; Gruppo 2: follow-up entro 30 giorni; Gruppo 3: follow-up a 30-60 giorni; Gruppo 4: follow-up a 60-90 giorni; Gruppo 5: follow-up a 90-120 giorni; Gruppo 6: follow-up a 120-150 giorni; Gruppo 7: a 150-180 giorni; Gruppo 8: follow-up a 180-240 giorni.

La linea all'interno dei *box-and-whiskers* rappresenta il valore mediano di IgM all'interno del gruppo. (*) Il grafico mostra che i soggetti affetti da leishmaniosi hanno concentrazioni di IgM significativamente più elevate rispetto ai soggetti sani sia al momento dell'ammissione (Gruppo 1) che a 60-90 giorni (Gruppo 3) di follow-up; (*) i valori di IgM all'ammissione, sono risultati significativamente più elevati rispetto ai valori riscontrati nei follow-up a 150-180 (Gruppo 7) ed a 180-240 (Gruppo 8) giorni dall'inizio del trattamento; (●) le concentrazioni di IgM rilevate nei gruppi controllo 6-7-8 sono risultate significativamente diminuite rispetto al Gruppo 3 (60-90 giorni). Le differenze riscontrate risultate significative ($p < 0,05$).

Nei grafici *box-and whiskers* di seguito esposti sono raffigurate le comparazioni tra le variazioni delle concentrazioni di immunoglobuline G ed M nei cani affetti da leishmaniosi nel follow-up in corso di trattamento rispetto al momento dell'ammissione espresse in termini percentuali.

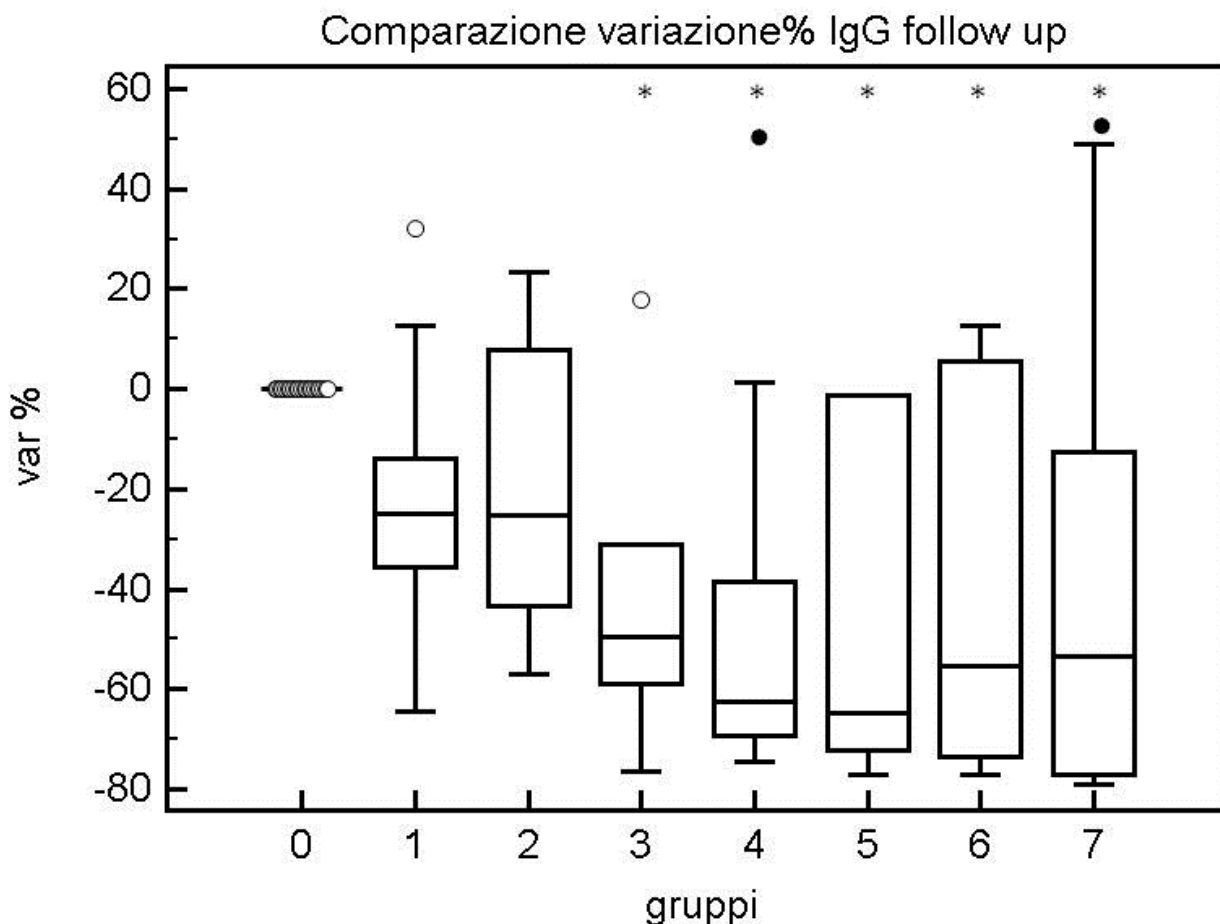


Grafico 55: Rappresentazione delle variazioni di IgG espressi in percentuali rispetto al valore ammissione nel follow-up in corso di trattamento. Gruppo 1: soggetti con leishmaniosi al momento dell'ammissione prima del trattamento; Gruppo 2: follow-up entro 30 giorni; Gruppo 3: follow-up a 30-60 giorni; Gruppo 4: follow-up a 60-90 giorni; Gruppo 5: follow-up a 90-120 giorni; Gruppo 6: follow-up a 120-150 giorni; Gruppo 7: a 150-180 giorni; Gruppo 8: follow-up a 180-240 giorni.

La linea all'interno dei *box-and-whiskers* rappresenta il valore % mediano della variazione delle IgM all'interno del gruppo rispetto al valore dell'ammissione. (*) Rispetto all'ammissione è stato riscontrato un decremento percentuale significativo dei valori di IgG nei gruppi 3-4-5-6 e 7; (●) per le concentrazioni di IgG rilevate a 60-90 giorni (Gruppo 2) è stato riscontrato un decremento significativo rispetto al gruppo 4. Le differenze riscontrate risultano altamente significative ($p < 0,001$).

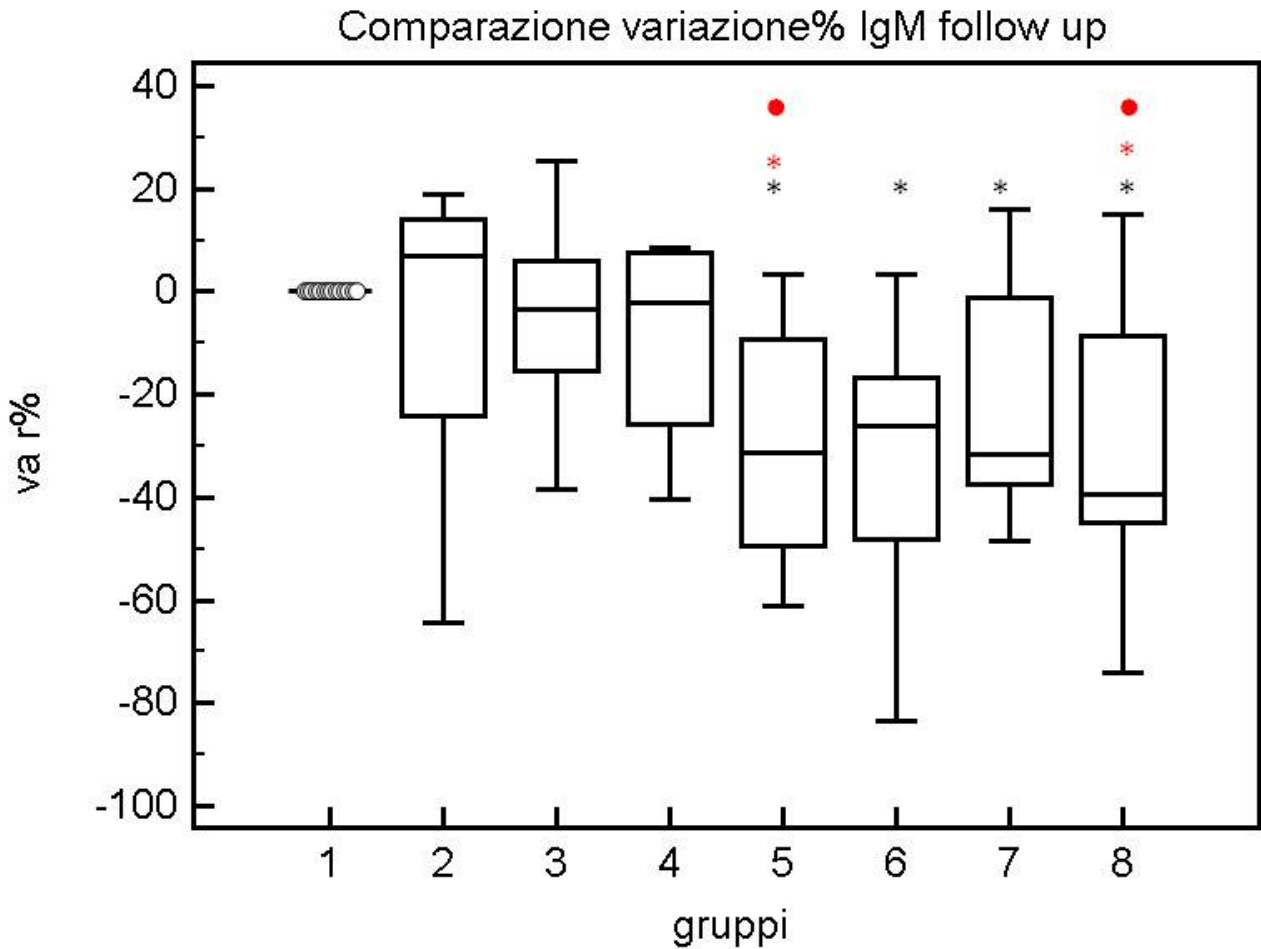


Grafico 56: Rappresentazione delle variazioni di IgM espressi in percentuali rispetto al valore ammissione nel follow-up in corso di trattamento. Gruppo 1: soggetti con leishmaniosi al momento dell'ammissione prima del trattamento; Gruppo 2: follow-up entro 30 giorni; Gruppo 3: follow-up a 30-60 giorni; Gruppo 4: follow-up a 60-90 giorni; Gruppo 5: follow-up a 90-120 giorni; Gruppo 6: follow-up a 120-150 giorni; Gruppo 7: a 150-180 giorni; Gruppo 8: follow-up a 180-240 giorni.

La linea all'interno dei *box and whiskers* rappresenta il valore % mediano della variazione delle IgM all'interno del gruppo rispetto ai valori dell'ammissione. (*) Rispetto all'ammissione è stato riscontrato un decremento percentuale significativo delle concentrazioni di IgM nei gruppi 5-6-7-8; (*) analogamente a quanto riscontrato all'ammissione, anche rispetto al gruppo follow-up entro 30 giorni (Gruppo 2) vi è un decremento delle concentrazioni di IgM statisticamente significativo nei gruppi 5-6-7-8; (●) nei gruppi 4 e 5 è stato riscontrato inoltre un decremento statisticamente significativo delle concentrazioni di IgM rispetto al gruppo di controllo a 60-90 giorni; (●) il Gruppo 8 (180-240 giorni) presentava infine concentrazioni di IgM significativamente ridotte anche rispetto al Gruppo 3 (60-90 giorni). Le differenze riscontrate risultano altamente significative ($p < 0,001$).

Nei seguenti grafici è illustrata la retta di regressione lineare relativa alle percentuali di decremento delle IgG ed IgM nei cani affetti da leishmaniosi nel follow-up in corso di trattamento rispetto al momento dell'ammissione.

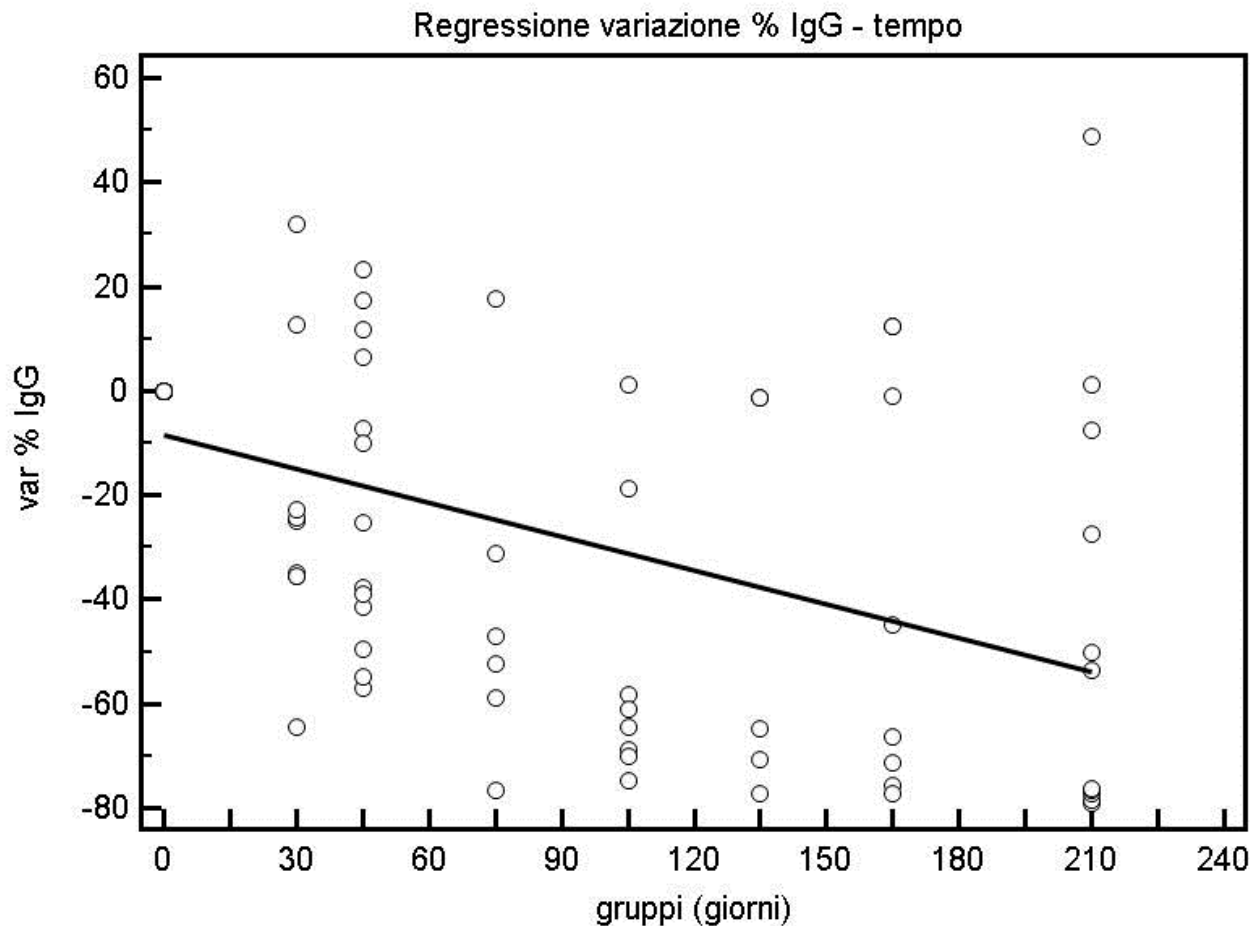


Grafico 56.: Rappresentazione della regressione lineare delle variazioni di IgG rispetto al valore ammissione espressi in percentuali nel follow-up in corso di trattamento. Il grafico illustra come in corso di trattamento anti-*leishmania* vi sia una graduale e progressiva riduzione delle concentrazioni di immunoglobuline G.

$$R^2 = 0,23$$

$$Y = -8,4961 + (-0,2163)$$

$$p < 0,001$$

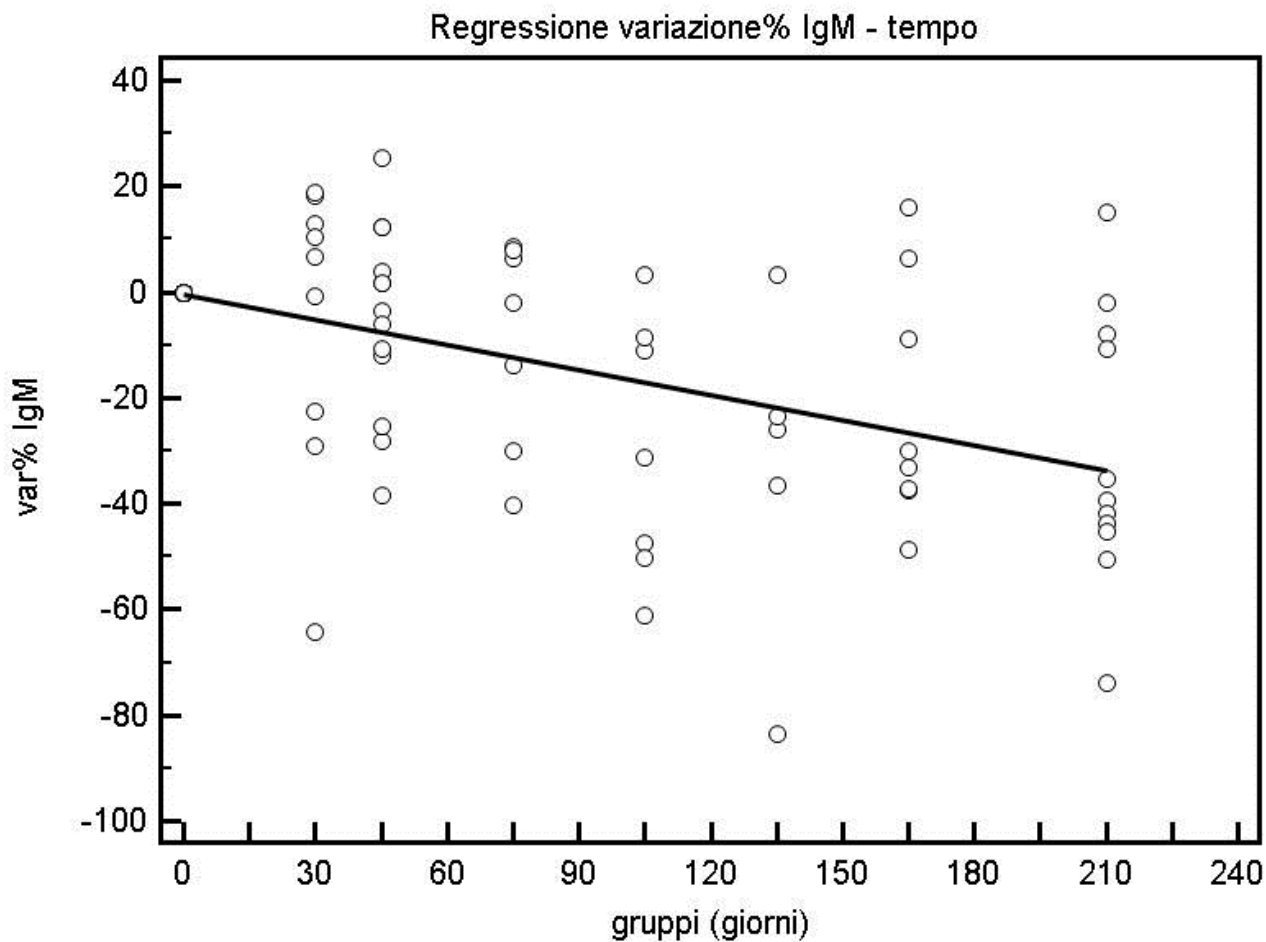


Grafico 56.: Rappresentazione della regressione lineare delle variazioni di IgM rispetto al valore ammissione espressi in percentuali nel follow-up in corso di trattamento. Il grafico illustra come in corso di trattamento anti-*leishmania* vi sia una graduale e progressiva riduzione delle concentrazioni di immunoglobuline M.

$R^2 = 0,26$

$Y = -0,5950 + (-0,1572)$

$p < 0,001$

4. Discussione

I risultati di questa tesi sono il frutto di una valutazione retrospettiva che ha permesso da una parte di raccogliere una grande quantità di dati clinici e clinicopatologici, ma che, d'altra parte, ha presentato i limiti di tale tipo di studio. Questi sono caratterizzati principalmente dalla mancanza di alcuni dati utilizzati per classificare correttamente i pazienti per la valutazione comparativa e in misura più ridotta per una corretta diagnosi eziologica. Alcuni soggetti con un quadro clinico suggestivo di leishmaniosi sono stati esclusi per mancanza di una conferma diagnostica adeguata, di un monitoraggio clinico e a causa degli scarsi approfondimenti diagnostici collaterali eseguiti. Allo stesso tempo, sono stati inclusi nel lavoro 15/181 soggetti che si presentavano paucisintomatici o con segni clinici compatibili con leishmaniosi, ma che avevano bassi titoli anticorpali (<1:160) all'immunofluorescenza indiretta. In alcuni di questi pazienti abbiamo riscontrato una situazione di precedente diagnosi eziologica e successivo trattamento da parte di colleghi liberi professionisti, eventualmente risalente a mesi o anni precedenti, che, in questi casi, non ci ha permesso di contestualizzare "correttamente" il titolo anticorpale ai segni clinici e clinicopatologici. Questi cani, come molti altri appartenenti alla popolazione ML, sono stati riferiti all'Ospedale Didattico Veterinario per una visita di consulenza per leishmaniosi, patologia che è stata confermata, ma che in questi casi si presentava ad uno stadio clinico di gravità inferiore rispetto ad altri. In altri casi non è stato possibile, a nostro parere, stabilire con certezza che la sintomatologia clinica fosse sostenuta da *Leishmania*, poiché tali animali presentavano un quadro clinico caratterizzato da una esagerata risposta umorale, ma che poteva essere imputabile ad altre patologie di tipo immunomediato/autoimmune concomitanti (poliartriti autoimmuni, ehrlichiosi, borreliosi, flogosi cronica). La valutazione statistica è stata effettuata sia escludendo, sia includendo tali pazienti (n=15), ma i risultati non sono stati differenti, per cui, dato l'esiguo numero di questi cani, si è deciso di non escluderli dalla popolazione di studio.

Per il nostro studio sono stati inclusi pazienti al momento dell'ammissione in clinica e valutati i dati clinici e laboratoristici relativi alla stessa. Coerentemente con quanto descritto in letteratura, anche nel nostro studio abbiamo riscontrato notevole variabilità per quanto riguarda lo stadio clinico dei pazienti, che variavano da soggetti asintomatici fino a soggetti con gravi forme cliniche (es.: insufficienza renale cronica con sindrome nefrosica). Questo ha permesso di identificare e meglio descrivere la presentazione clinica della malattia nella pratica veterinaria quotidiana della nostra struttura, ma ha determinato una valutazione statistica di pazienti, a volte, molto disomogenei tra loro sia dal punto di vista clinico sia da quello clinicopatologico.

La casistica raccolta è risultata elevata se comparata a quella riportata in letteratura e nel complesso piuttosto completa per i dati oggetto di studio. Le carenze maggiori sono state quelle che

riguardavano la misurazione delle proteine di fase acuta e dei parametri coagulativi (presenti in un 30% di casi) e, in misura minore, la determinazione quantitativa dell'albuminuria (presente nel 60% dei casi). Ciò è dovuto probabilmente al fatto che tali parametri utilizzano metodiche di recente introduzione nella pratica clinica con limitate evidenze scientifiche, ma soprattutto per il costo di queste misurazioni che spesso non è sostenibile dal proprietario. La valutazione ambulatoriale di base di una cane riferito per leishmaniosi prevede solitamente un protocollo diagnostico composto da visita clinica, valutazione del titolo anticorpale, esame citologico, esame emocromocitometrico, esame biochimico, esame delle urine a cui seguono poi la terapia e i successivi controlli, con un costo iniziale che può raggiungere facilmente e superare i 200 euro.

Nella nostra casistica, l'età dei soggetti affetti da leishmaniosi aveva una mediana di 5 anni e comprendeva soggetti molto giovani, anche sotto l'anno di età, ed alcuni soggetti anziani. Tuttavia è stato possibile affermare che le forme cliniche di leishmaniosi colpiscono principalmente cani adulti con un picco che nel nostro studio si è presentato a 4 anni. Tale dato è in parziale accordo con la letteratura in cui sono riportati frequentemente due picchi comprendenti pazienti fino a 3 anni e tra 8 e 10 anni, rispettivamente (Abranches et al. 1991a; Alvar et al. 2004; Cardoso et al., 2004).

Nel nostro studio i maschi sembrano essere maggiormente coinvolti e rappresentano il 65% dei casi. Questi risultati confermano in parte quelli presenti in letteratura in cui è stata riscontrata una maggiore frequenza nel sesso maschile (Zaffaroni et al., 1999; Zivicnjak et al., 2005) anche se altri autori non hanno riportato una maggiore predisposizione legata al genere (Abranches et al., 1991a; Mirò et al., 2007).

I cani meticci rappresentano circa la metà dei casi inclusi, mentre le razze più rappresentate (con frequenze non superiori al 5%) sono state il Setter inglese, il Boxer e il Doberman pinscher. Tra queste, il Boxer sembrerebbe essere una razza sovrarappresentata anche in letteratura, tuttavia non possiamo trarre nessuna conclusione sui dati ottenuti se non ipotizzare che probabilmente possono essere influenzati dalla diffusione delle razze sul territorio italiano (dati F.C.I. disponibili on line).

E' importante sottolineare che la letteratura clinica consultata riporta frequenze di sintomi clinici e clinicopatologici estremamente variabili e influenzate dal periodo oggetto di studio, dal numero di casi arruolati e dal tipo di indagine eseguita (retrospettiva, prospettica, o trial clinico randomizzato a finalità terapeutica). Per tali motivi, non esistono a tutt'oggi dati considerati definitivi in merito e quelli che secondo alcuni autori sono segni "tipici" di leishmaniosi, mentre per altri sono segni sporadici o trascurabili. Il confronto con la letteratura, di conseguenza, è risultato a tratti complesso per ciò che riguarda l'epidemiologia di queste alterazioni e anche l'esposizione di questi risultati comparativi non potrà essere, per forza di cose, esaustiva.

I segni clinici più frequentemente rilevati nella nostra coorte di soggetti sono comunque in accordo con la letteratura e sono principalmente riconducibili a dermatopatie croniche associate a linfadenomegalia sistemica (30-50% dei soggetti). In letteratura sono riportate, tuttavia, frequenze superiori per questi segni clinici che in alcuni studi raggiungono anche il 90% (Baneth, 2006; Fondati, 2010). Altri segni considerati caratteristici di leishmaniosi come segni oculari, epatosplenomegalia, epistassi ed onicogrifosi non hanno superato il 5%. Anche in questo caso la letteratura riporta risultati contrastanti soprattutto per quanto riguarda l'onicogrifosi che in alcuni lavori raggiunge percentuali del 79 % (Alvar et al., 2004), mentre in altri sono riportate frequenze nettamente inferiori (20-30%) (Baneth et al., 2008). Analogamente, i segni oculari hanno frequenze variabili in letteratura dal 16 all'80% circa (Crotti, 2010), a differenza di quanto riportato nella nostra casistica. Molti animali, inoltre, presentano segni clinici aspecifici quali dimagrimento, anoressia, astenia, segni gastroenterici, pallore delle mucose e più raramente zoppia con percentuali variabili dal 10 al 20%. In letteratura, sono riportati prevalenze molto diverse che, ad esempio, per quanto riguarda segni gastroenterici e zoppia possono raggiungere anche il 30% o il 40 % rispettivamente (Slappendel et al., 1988; Baneth, 2006).

La presenza di poliuria/polidipsia è stata rilevata nel 20% dei casi con una prevalenza superiore rispetto a quanto riportato in letteratura dove solitamente la frequenza è attorno al 10% dei casi (Alvar et al., 2004, Solano-Gallego et al., 2009). Tale reperto clinico è generalmente associato alla malattia renale cronica causata dalla leishmaniosi. L'elevata frequenza di tale segno clinico da noi riscontrato, quindi, potrebbe essere in parte dovuta al fatto che nella nostra realtà clinica molti di questi pazienti vengono riferiti all'Ospedale Didattico Veterinario per una consulenza nefrologica a seguito del rilievo di proteinuria persistente e/o segni clinici compatibili con glomerulopatie.

I principali segni clinicopatologici riscontrati nel nostro studio sono conformi a quanto riportato in letteratura e riguardano, soprattutto, alterazioni nella concentrazione delle proteine plasmatiche caratterizzate da iperprotidemia, iperglobulinemia, iperyglobulinemia, riduzione del rapporto A/G e ipoalbuminemia con frequenze variabili dal 40 all'80% circa dei casi. Queste alterazioni sono imputabili all'intensa risposta immune caratterizzata da un lato da una risposta di tipo umorale (produzione anticorpale) e dall'altro da una risposta innata meglio definita come risposta di fase acuta (APR). La presenza di APR può essere sospettata in una percentuale relativamente elevata di pazienti in base all'aumento delle concentrazioni di proteine di fase acuta positive quali la CRP (67%) o la diminuzione delle concentrazioni di proteine di fase acuta negative quali albumina e transferrina (TIBC) associate o meno ad alterazioni della conta leucocitaria.

Altro reperto riscontrato frequentemente nella nostra coorte è la proteinuria con frequenze che si trovano intorno al 60%. Il rilievo di proteinuria, parzialmente in linea con la letteratura, è considerarsi un dato molto importante e sottolinea che più della metà dei soggetti con leishmaniosi è affetto da nefropatia di tipologia e gravità differente. La proteinuria, inoltre, può influenzare molti dei parametri riportati precedentemente e potrebbe competere all'ipoalbuminemia, alla riduzione del rapporto A/G e alla riduzione delle concentrazioni di transferrina e antitrombina III. Tale dato trova conferma nella correlazione significativa e negativa esistente tra albuminemia e proteinuria espressa come UPC e nella correlazione positiva tra albuminemia e tranferrinemia (vedi dati nella sezione risultati).

Alla luce dei risultati ottenuti, abbiamo ritenuto opportuno quindi operare un confronto tra pazienti nefropatici e non nefropatici per comprendere come la malattia renale potesse influenzare i risultati di laboratorio e viceversa anche per capire quali fossero le alterazioni più caratteristiche della nefropatia in corso di leishmaniosi. I soggetti nefropatici in particolare (52%) presentano maggiori titoli anticorpali, più elevate concentrazioni globuliniche e γ globuliniche associate ad ipoalbuminemia e riduzione del rapporto A/G più gravi rispetto ai non nefropatici. Ciò conferma quanto riportato per la popolazione generale affetta da leishmaniosi e può essere spiegato da una maggior risposta umorale associata alla comparsa di una nefropatia cronica proteino-disperdente. La proteinuria in questi pazienti può spiegare inoltre la riduzione significativa delle concentrazioni di transferrina e antitrombina III riscontrata nei soggetti KD.

L'anemia è stato un reperto clinicopatologico di frequente riscontro (55,6%) nella nostra casistica. Tale dato può essere spiegato attraverso una patogenesi multifattoriale che coinvolge un'inflammatione cronica con un'importante APR e un possibile coinvolgimento del midollo osseo a seguito della disseminazione del parassita. Il confronto tra soggetti anemici e non anemici, infatti, ha permesso di evidenziare come i pazienti affetti da anemia presentassero maggiori titoli anticorpali, maggiori iperprotidemia, iperglobulinemia ed in particolar modo iperyglobulinemia associate ad una significativa e più grave ipoalbuminemia con riduzione del rapporto A/G. Questi dati ci permettono di ipotizzare che i soggetti anemici siano sottoposti verosimilmente ad una maggior risposta umorale e conseguente risposta infiammatoria cronica. Le correlazioni negativa e positiva evidenziate tra ematocrito e concentrazione di proteine totali e di albumine, rispettivamente, confermano ulteriormente questa ipotesi così come le concentrazioni di ferro totale e transferrina. Ferro totale, transferrina e albumina rappresentano infatti dei reattivi di fase acuta negativi e il loro utilizzo combinato è risultato estremamente utile per comprendere meglio questi meccanismi.

Un altro fattore che può essere implicato nella patogenesi dell'anemia è la malattia renale cronica che come noto è in grado di determinare la comparsa di anemia con numerosi meccanismi quali secrezione inappropriata di eritropoietina, iperparatiroidismo secondario, malnutrizione e sanguinamento gastroenterici associati a carenza di ferro. Tale dato è confermato dal confronto del valore ematocrito tra pazienti nefropatici e non nefropatici che evidenzia una riduzione significativa del valore ematocrito nei soggetti leishmaniotici con malattia renale.

In questo studio sono state inoltre misurate e studiate per la prima volta in corso di leishmaniosi canina contratta naturalmente le variazioni delle concentrazioni di IgG e di IgM durante follow-up in corso di trattamento anti-*leishmania*. A nostra conoscenza, l'unico lavoro presente in letteratura in cui sono state misurate le concentrazioni totali di IgG e IgM durante follow-up in corso di trattamento ha riguardato infatti un gruppo di cani in cui l'infezione e la malattia sono stati indotti sperimentalmente (Martine-Subiela, 2011). Nella maggior parte dei lavori in cui è stata valutata la risposta umorale in corso di leishmaniosi contratta sia naturalmente sia indotta sperimentalmente sono state infatti misurate esclusivamente la cinetica e la distribuzione delle varie classi di Ig specifiche anti-*leishmania* con particolare interesse per le concentrazioni di IgG che rappresentano la classe di immunoglobuline maggiormente prodotte in corso di LCan. Tuttavia, in corso di leishmaniosi la risposta umorale è caratterizzata da una produzione esagerata di immunoglobuline non solo anti-*leishmania* specifiche ma anche aspecifiche che contribuiscono a determinare lo stato clinico dell'animale.

Nel nostro studio i cani affetti da leishmaniosi presentavano concentrazioni di IgG significativamente più elevate rispetto ai soggetti sani sia al momento dell'ammissione che nei successivi controlli fino a 150-240 giorni dall'inizio del trattamento anti-*leishmania* in cui le concentrazioni ritornavano sovrapponibili a quelle del gruppo di soggetti sani. Nonostante sia stato possibile evidenziare un progressivo decremento del valore delle IgG nei successivi controlli a partire dall'inizio del trattamento, rispetto ai valori riscontrati all'ammissione le concentrazioni di IgG sono risultate diminuite in maniera statisticamente significativa a partire da 150 giorni dall'inizio del trattamento. Anche per le IgM è stato possibile affermare che le loro concentrazioni all'ammissione rispetto al gruppo di controllo di soggetti sani erano significativamente aumentate e come per le IgG rispetto ai valori riscontrati all'ammissione, le concentrazioni sono risultate diminuite in maniera statisticamente significativa a partire da 150 giorni dall'inizio del trattamento. Questo dato richiama quanto verificato da altri autori in cui è stato riscontrato che le concentrazioni di questa classe di immunoglobuline, che sono classicamente associate alle forme infettive acute, nella LCan persistono anche negli stadi cronici (de Freitas et al., 2012) contribuendo quindi ad aggravare la sintomatologia clinica a causa della formazione di immunocomplessi.

Differentemente da quanto riscontrato nello studio di Marinez-Subiela e collaboratori, nel nostro lavoro è stato possibile affermare che in corso di trattamento anti-*leishmania* le concentrazioni di IgG e IgM subiscono una progressiva e significativa riduzione in termini statistici confermando pertanto l'efficacia del trattamento anti-*leishmania* non solo nella remissione della sintomatologia clinica, ma anche nel ripristino della normale risposta linfocitaria. I risultati da noi ottenuti sono da considerarsi preliminari, poiché non è stato effettuato un confronto tra l'andamento della risposta umorale ed il quadro clinico e clinicopatologico (proteine totali, rapporto albumine/globuline, proteine di fase acuta) dei soggetti al momento dei controlli. In futuro, per meglio applicare la risposta anticorpale in ambito clinico sarà quindi necessario confermare i risultati ottenuti correlando IgG ed IgM al quadro clinico soprattutto in relazione alla comparsa di recidive includendo nello studio controlli oltre l'anno dal termine del trattamento.

Dal momento che in corso di LCan la risposta proliferativa policlonale precede la comparsa della sintomatologia questo tipo di approccio può permettere di anticipare la comparsa della sintomatologia e quindi la ripresa del trattamento anti-*leishmania*. In corso di malattia le prime immunoglobuline ad essere prodotte sono le IgM che rappresentano la classe di immunoglobuline con caratteristiche cinetiche più simili alle APP che rappresentano la risposta innata dell'organismo. Nel nostro studio non è stato possibile stabilire se fosse avvenuto prima un incremento delle IgM piuttosto che quello delle IgG poiché in corso di infezione naturale non è possibile stabilire con esattezza il momento in cui avviene l'infezione. Sarebbe interessante pertanto verificare quale classe di Ig subisce dapprima l'incremento in corso di recidiva. Inoltre, in futuro sarà interessante valutare l'andamento della risposta anticorpale in relazione sia allo stato clinico del soggetto al momento della diagnosi sia in relazione al tipo di trattamento farmacologico intrapreso.

In conclusione è possibile affermare che la leishmaniosi nel cane è una patologia relativamente frequente nella nostra realtà clinica universitaria e che presenta caratteristiche cliniche e clinicopatologiche simili a quelle riportate in letteratura. I nostri risultati preliminari suggeriscono che in questa malattia il coinvolgimento renale e le conseguenze sistemiche che ne derivano possono essere predominanti a livello clinico e laboratoristico anche se non tutti i cani affetti da leishmaniosi presentano segni di danno renale e potrebbero non svilupparli mai nel corso della malattia. La gravità del quadro clinico appare associata in maniera significativa all'entità della risposta umorale e del successivo coinvolgimento glomerulare nel contesto di una risposta infiammatoria sistemica cronica.

Bibliografia

1. **Adamama-Moraitou K.K., Rallis T., Koutinas A.F., Tontis D., Plevraki K., Kritsepi M.:** Asintomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 76, pag. 53-57, **2007**.
2. **Abranches P., Santos-Gomes G., Rachamin N., Campino L., Schnur L., Jaffe C.L.:** An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*. Vol. 13, pag. 537-550, **1991b**.
3. **Abranches P., Silva-Pereira M.C., Conceicao-Silva F.M., Garcia S., Garcia A., Caballero M.J., Molina R.:** Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *Journal of Parasitology*. Vol. 77, pag. 557-561, **1991a**.
4. **Agut A., Corzo N., Murciano J., Laredo F.G., Soler M.:** Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Veterinary Record*. Vol. 153, pag. 648-652, **2003**.
5. **Alvar J., Canavate C., Molina R., Moreno J. and Nieto J.:** Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*. Vol. 57, pag. 1-88; **2004**.
6. **Alvar J., Aparicio P., Aseffa A., Den Boer M., Canavate C., Dedet J.P., Gradoni L., Ter Horst R., Lopez-Valez R., Moreno J.:** The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. In: *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 21, pag. 334-359, **2008**.
7. **Amusatogui I, Sainz A., Rodriguez F., Tesouro M.A. :** Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*. Vol. 18, pag.147-156, **2003**.
8. **Antognoni M.T., Biretoni F., Miglio A., Lalli P., Poriello F., Magilli Pecci V.:** Monoclonal gammopathy associated with multiple myeloma and visceral leishmaniosis in the dog: a comparison of two cases. In: *Veterinary Research Communication*. Vol. 34 suppl., S97-101, 2010.
9. **Atlet L., Francino O., Solano-Galleg G.L., Renier C., Sanchez A.:** Mapping and sequencing of canine NRAMP1 gene and identification of mutation in leishmaniasis-susceptible dog. In: *Infection and Immunity*. Vol. 70, pag. 2763-2771, **2002**.
10. **Baneth G.:** Leishmaniosi. In: Green C.E.: *Infectious disease of the dog and cat*. III ed., Saunders Elsevier, St. Louis, cap. 73, pag. 685-698, **2006**.

11. **Baneth G., Koutinas F.A., Solano-Gallego L., Bourdeau P. and Ferrer L.** : Canine leishmaniasis. New concepts and insight on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*. Vol. 24, pag. 324-330, **2008**.
12. **Barbieri C.L.** : Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*. Vol. 28, pag. 329-337, **2006**.
13. **Benderitter T., Casanova P., Nashkidachrili L., Quilici M.** : Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. Vol. 82, pag. 335-341, **1988**.
14. **Bilidik A., Kogin F., Seyrek K., Pasa S., Ozensoy S.** : Oxidative system and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*. Vol. 77, pag. 63-66, **2004**.
15. **Boggiatto P.M., Ramer-Tait A.E., Metz K., Kramer E.E., Gibson-Corley K., Mullin K., Hostetter J.M., Gallup J.M., Jones D.E., Peterson C.A.** : Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 17, pag. 267-273, **2010**.
16. **Brandonisio O., Carelli G., Altamura M., Varvara B., Ceci L.** : Circulating immune complex and autoantibodies in canine leishmaniasis. *Parassitologia*. Vol. 32, pag. 275-281, **1990**.
17. **Bruno B., Borrelli A., Falco S., Maurella C., Zanatta R., Tarducci A.** : Valutazione delle alterazioni emostatiche in cani affetti da leishmaniosi infantum tramite tromboelastometro (TEM) ed analizzatore della funzionalità piastrinica (PFA- 100) risultati preliminari. In: *Atti del 2° Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi canina*. Pisa, pag. 140-142, **2010**.
18. **Bueno R., Carvalho neta A.V., Xavier M.N., Oliveira R.G., Diniz S.A., Melo M.N., Santos R.L.**: cDNA sequencing and expression of Nramp1 (Slc11a1) in dogs phenotypically resistant or susceptible to visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 127, pag. 332-339, **2009**.
19. **Cardoso L., Rodriguez M., Santos H., Schoone G.J., Carreta P., Varejao E., Van Benthem B., Afonso M.A., Albes-Pires C., Semiao-Santos S.J., Rodriguez J., Schallig H.D.** : Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. Infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology*. Vol. 121, pag. 21-32, **2004**.
20. **Cardoso L., Schallig H.D., Cordeiro-da-Silva A., Cabral M., Alunda J.M., Rodrigues M.** : Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 117, pag. 35-41, **2007**.

21. **Carrillo E., Moreno J.** : Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 128, pag. 67-70, **2009**.
22. **Carson C., Quinnel R.J., Day J.M., Courtenay O.** : Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of canine IgG1 and IgG2, and associations with infection outcome in *Leishmania infantum* naturally infected dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 133, pag. 264-268, **2010**.
23. **Ceci L., Sassanelli M., Carelli G.**: Interazione ospite-parassita e patogenesi. In: *La Leishmaniosi canina*. Edizioni SCIVAC, Milano, pag. 23-30, **1989**.
24. **Ciaramella P., Corona M.** : Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. Vol. 25, pag. 358-368, **2003**.
25. **Ciaramella P., Oliva G., Luna R.D., gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A., Persechino A.** : A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dog naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*. Vol. 141, pag. 539-543, **1997**.
26. **Ciaramella P., Pelagalli A., Cortese L., Pero M.E., Corona M., Lombardi P., Avallone L., Persechino A.** : Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Journal*. Vol. 169, pag. 465-467, **2005**.
27. **Cortese L., Pelagalli A., Piantedosi D., Mastellone V., Manca A., Lombardi P., Ciaramella P., Avallone L.**: Platelet aggregation and haemostatic response in dog naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol. 53, pag. 546-548, **2006**.
28. **Cortadellas O., Fernandez del Palacio M.J., Talavera J., Bayon A.** : Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol. 22, pag. 293-300, **2008**.
29. **Cortadellas O., Fernandez del Palacio M.J., Bayon A., Albert A., Talavera J.**: Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol. 20, pag. 941-947, **2006**.
30. **Cortese L., Sica M., Piantedosi D., Ruggiero G., Pero M. E., Terrazzano G., Mastellone V., Ciaramella P.** : Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*. Vol. 164, pag. 778-782, **2009**.
31. **Costa F.A.L., G., Saldanha L.C.B., Silva S.M.M., Senhorini I.L., Silva T.C., Guerra J.L.**: Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology*. Vol. 40, pag. 677-684, **2003**.

32. **Costa F.A.L., Prianti M.G., Silva T.C., Silva S.M.M.S., Klein R.P., Guerra J.L., Goto H.** : T cell adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. In: *BMC infectious disease*. Vol. 10, pag. 1-12, **2010**.
33. **Coutinho M.T., Linardi P.M.** : Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. *Veterinary Parasitology*. Vol. 147, pag. 320-325, **2007**.
34. **Crotti A.** : Leishmaniosi canina: anche l'occhio vuole la sua parte! In: *Atti del 2° Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi canina*. Pisa, pag. 14-20, **2010**.
35. **Dantas-Torres F.** : Ticks as vectors of Leishmania parasites. *Trends in Parasitology*. Vol. 27, pag. 155-159, **2011**.
36. **Day M.J.** Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Veterinary Parasitology*. Vol. 147, pag. 2-8, **2007**.
37. **de Luna R., Ferrante M., Saverino L., Ambrosio R., Piantedosi D., Gradoni L., Lucisano A., Persechino A.** : Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anemia. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 122, pag. 213-216, **2000**.
38. **Desieux P.** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. In: *Comparative Immunology, Microbiology of infectious disease* .Vol. 27, pag. 305-318, **2004**.
39. **Deplazes P., Smith N.C., Arnold P., Lutz H., Eckert J.** : Specific Ig1 and Ig2 antibody responses of dogs to Leishmania infantum and other parasites. *Parasite Immunology*. Vol. 17, pag 451-458, **1994**.
40. **de Freitas E., Melo M.N., da Costa-Val A.P., Michalick M.S.** : Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*. Vol. 137, pag. 159-167, **2006**.
41. **de Freitas J.C.C., Lopes-Neto B.E., de Abreu C.R.A., Coura-Vital W., Braga S.L., Reis A.B., Nunes-Pinheiro D.C.S.:** Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*. Articolo in stampa. **2012**
42. **de Souza A.I., Juliano R.S., Gomes T.S., de Araujo Diniz S., Borges A.M., Tafuri W.L., Santos R.L.** : Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Veterinary Parasitology*. Vol. 129, pag. 51-54, **2005**.
43. **Ferrer L.** : Leishmaniosi. In Bonagura J.D., Kirk W.R. : *Kirk's Current Veterinary Therapy*. XI ed., Saunder Company W.B., Pennsylvania, pag 267-271, **1992**.

44. **Ferrer L., Aisa M.J., Roura X., Portus M.** : Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Record*. Vol. 136, pag. 514-516, **1995**.
45. **Ferreira M.G., Fattori K.R., Souza F., Lima V.M.**: Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*. Vol. 165, pag. 150-154, **2009**.
46. **Ferroglio E., Centaro E., Mignone W., Triscioglio A.** : Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and western blot. *Veterinary Parasitology*. Vol. 144, pag. 162-166, **2007**.
47. **Ferreira E., Lara M., Carneiro M., Reis A., Paes D., Silva E., Shalling H., Gontijo C.** : Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral Leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestation. *Veterinary Parasitology*. Vol. 146, pag. 235-241, **2007**.
48. **Foglia Manzillo V., Restucci B., Pagano A., Gradoni L., Oliva G.** : Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Veterinary Record*. Vol. 158, pag. 690-694, **2006**.
49. **Fondati A.** : Il coinvolgimento cutaneo nella leishmaniosi canina. In: *Atti del 2° Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi canina*. Pisa, pag. 23-28, **2010**.
50. **Font A., Closa M.J., Mascort J.**: Monoclonal gammopathy in a dog with visceral leishmaniasis. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol. 8, pag. 233-235, **1994**.
51. **Font A., Durall N., Domingo M., Closa J.M., Mascort J., Ferrer L.** : Cardiac tamponade in a dog with visceral leishmaniasis. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Vol. 29, pag. 95-100, **1993**.
52. **Font A., Roura X., Fondevila D., Closa J.M., Mascort J., Ferrer L.** : Canine mucosal leishmaniasis. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Vol. 32, pag. 131-137, **1996**.
53. **Gantt K. R., Schultz-Cherry S., Roudriguez N., Jeronimo S.M., Nascimento E.T., Goldman T.R., Recker T.J., Miller M.A., Wilson M.E.** : Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *Journal of Immunology*. Vol. 170, pag. 2613-2620, **2003**.
54. **Garcia-Alonso M., Nieto C.G., Blanco A., Requena J.M., Alonso C., Navarrete I.** : Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunology*. Vol. 18, pag. 539-546, **1996**.

55. **Giraudel J.M., Pages J.P., Guelfi J.F.** : Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Vol. 135, pag. 135-147, 2002.
56. **Giger U.** : Anemie non rigenerative causate da perdite di sangue o emolisi. In: Ettinger S.J., Feldman E.C. : *Clinica Medica Veterinaria- Malattie del cane e del gatto*. VI ed., Elsevier Massons, Milano, vol. 2, cap. 270, pag. 1930-1951, **2005**.
57. **G.L.S.C. : Gruppo di studio sulla leishmaniosi canina (a cura di: Crotti A., Fondati A., Gradoni L., Lubas G., Maroli M., Oliva G., Solano-Gallego L., Paltrinieri S., Roura X., Zatelli A., Zini E.)**: Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadi azione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte I: Approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico. *Veterinaria*. Vol. 21, **2007**.
58. **G.L.S.C. : Gruppo di studio sulla leishmaniosi canina (a cura di: Crotti A., Fondati A., Gradoni L., Lubas G., Maroli M., Oliva G., Solano-Gallego L., Paltrinieri S., Roura X., Zatelli A., Zini E.)**: Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadi azione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte II: Approccio terapeutico. *Veterinaria*. Vol. 22, **2008**.
59. **Gradoni L.**: The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sevilla, pag. 7-14, **2002**.
60. **Iniesta L., Gallego M., Portus M.**: Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 103, pag. 77-81, **2003**.
61. **IRIS International Renal Interest Society** www.iris-kidney.com
62. **Lanotte G., Rioux J.A., Piereres J., Vollhart Y.**: Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Annales de Parasitologie Humaine et comparée*. Vol. 54, pag. 277-295, **1979**.
63. **Lage R.S., Oliveira G.C., Busek S.U., Guerra L.L., Giunchetti R.C., Correa-Oliveira R., Reis A.B.** : Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 115, pag. 135-145, **2007**.
64. **Leandro C., Santos-Gomes G.M., Campino L., Romão P., Cortes S., Rolão N., Gomes-Pereira S., Riça Capela M.J., Abranches P.** : Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 79, pag. 273-284, **2001**.

65. **Lomtadze M.L., Khochava M.A., Shalamberidze I.A., Kharaishvili VI, Vordob'eva E.O.**: Study of intravascular coagulation activators markers in patient with visceral leishmaniosis. *Georgian medical news*. Vol. 124-125, pag. 47-50, **2005**.
66. **Jüttner C., Rodríguez Sánchez M., Rollán Landeras E., Slappendel R.J., Fragío Arnold C.** : Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Veterinary Record*. Vol. 149, pag. 176-179, **2001**.
67. **Koutinas A.** : Diagnostic implications of Hematology and lymphnode cytology in canine leishmaniosis. In: *Atti del 2° Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi canina*. Pisa, pag. 36-43, **2010**.
68. **Koutinas A.F., Mylonakis M.E.**: Canine leishmaniasis complicated by tick-borne disease, common in the Mediterranean countries. In: *Atti del 2° Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi canina*. Pisa, pag. 44-50, **2010**.
69. **Koutinas A.F., Kontos V., Kaldrimidou H., Lekkas S.**: Canine leishmaniasis: Associated nephropathy: A clinical, clinicopathologic and pathologic study in 14 spontaneous cases with proteinuria. *European Journal of Companion Animal Practice*. Vol. 5, pag. 31-37, **1995**.
70. **Koutinas A.F., Polizopoulou, Saridomichelakis M.N., Argyriadis D., Fytianou A., Plevraki K.G.** : Clinical consideration on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*. Vol. 35, pag. 376-383, **1999**.
71. **Maia C., Campino L.** : Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*. Vol. 158, pag. 274-287, **2008**.
72. **Maia C., Campino L.** : Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. *Journal of Tropical Medicine*. **2012** in press, disponibile in preview su <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3154519/pdf/JTM2012-541571.pdf>.
73. **Makni S., Ayed K., Said M., Rachid B.M.** : Study of circulating immune-complex during the evolution of visceral Mediterranean leishmaniasis. In: *Annals of tropical Medicine and Parasitology*. Vol. 83, pag. 349-355, **1989**.
74. **Mancianti F.** : Diagnosi eziologica della Leishmaniosi canina. In: *Atti del 2° Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi canina*. Pisa, pag. 51-57, **2010**.
75. **Mancianti F., Falcone M.L., Gianneli C., Poli A.** : Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergente-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescent for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. Vol. 59, pag. 13-21, **1995**.

76. **Mancianti F., Gramiccia M., Gradoni L., Pieri S.** : Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 82, pag. 566-567, **1988**.
77. **Manzillo F., Restucci B., Pagano A., Gradoni L., Oliva G.** : Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Veterinary Record*. Vol. 158, pag. 690-694, **2006**.
78. **Maroli M.** : Prospettive di lotta e di prevenzione contro i vettori di Leishmaniosi. In: *Atti del 2° Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi canina*. Pisa, pag. 58-64, **2010**.
79. **Maroli M., Rossi L., Baldelli R., Capelli G., Ferroglio E., Genchi G., Gramiccia M., Mortarino M., Pietrobelli M., Gradoni L.** : The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine & International Health*. Vol. 13, pag. 256-264, 2008.
80. **Martinez-Moreno A., Martinez-Cruz M.S., Blanco A., Hernandez-Rodriguez S.**: Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. In: *Veterinary Parasitology*. Vol. 51, pag. 49-59, 1993.
81. **Martinez-Subiela S., Bernal L.J., Josè J., Ceron J.** : Serum concentration of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 64, pag. 1021-1026, 2003.
82. **Martinez-Subiela S., Tecles F., Eckersall P.D., Ceron J.J.** : Serum concentration of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Veterinary Record*. Vol. 150, pag. 241-244, 2002.
83. **Martinez-Subiela S., Strauss-Ayali D., Ceron J.J., Baneth G.**: Acute phase proteins response in canine experimental leishmaniosis. In: *Veterinary Parasitology*. Vol. 180, pag. 197-202, **2011**.
84. **Menezes-Souza D., Corrêa-Oliveira R., Guerra-Sac R., Cordeiro R., Giunchetti, Teixeira-Carvalho A., Assis Martins-Filho O., Oliveira G.C., Reis A.B.** : Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. *Veterinary Parasitology*. Vol. 177, pag. 39-49, 2011.
85. **Mettler M., Grimm F., Capelli G., Camp H., Deplazes P.** : Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay, an immunofluorescent-antibody tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic *Leishmania* infection in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43, pag. 5515-5519, **2005**.

86. **Michalsky E.M., Rocha M.F., da Rocha Lima A.C., Franca-Silva J.C., Pires M.Q., Oliverira F.S., Pacheco R.S., Doss Santos S.L., Barata R.A., Romanha A.J., Fortes Dias C.L., Dias E.S.** : Infectivity of sieropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis*, phlebotomines and sand flies. *Veterinary Parasitology*. Vol. 147, pag. 67-76, **2007**.
87. **Molina R., Amela C., Nieto J., Sant-Andres M., Gonzalez F., Castillo J.A., Lucientes J., Alvar J.** : Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomum perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 88, pag. 491-493, **1994**.
88. **Moreira M.A., Luvizotto M.C., Garcia J.F., Corbett C.E., Laurenti M.D.** : Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*. Vol. 145, pag. 245-252, **2007**.
89. **Moreno J., Nieto J., Chamizo C., Gomzales F., Blanco F., Barken D.C., Alvar J.**: The immune response and PBMC subset in canine visceral leishmaniasis and after chemotherapy. In: *Veterinary Immunology*. Vol. 70. Pag. 181,195, **1999**.
90. **Nieto C.G., Navarrete I., Habela M.A., Serrano F., Redondo E.**: Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. In: *Veterinary Parasitology*. Vol. 45, pag. 33-47, **1992**.
91. **Oliva G., Scalone A., Foglia Manzillo V., Gramiccia M.** : Incidence and time course of *Leishmania infantum* infection examined by parasitological, serological, and nested-PCR techniques in a color of naive dogs exposed to these consecutive transmission season. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 44, pag. 1318-1322, **2006**.
92. **Otranto D., Capelli G., Genchi C.** : Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasites & Vectors*. Vol. 2 (suppl. 2), pag. 1-8, **2009**.
93. **Pampiglione C.T.** : Protozoologia. In: Pampiglione C.T. : *Guida allo studio della parassitologia*. Società Editrici Euscalpio, III ed, pag. 39-122, **1999**.
94. **Paltrinieri S., Bertolazzo W., Giordano A.** : Alterazioni delle proteine plasmatiche. In Paltrinieri S., Bertolazzo W., Giordano A.: *Patologia clinica del cane e del gatto approccio pratico alla diagnostica di laboratorio*. Prima edizione, Elsevier SRL, Trento, cap.4, pag. 65-69, **2010**.
95. **Peña M.T., Naranio C., Klauss G., Fardevilla D., Leiva M., Roura X., Davidson M.G., Dubielzig R.R.** : Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 138, pag 32-39, **2008**.

96. **Peña M.T., Roura X., Davidson M.G.** : Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs:105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*. Vol. 3, pag. 35-41, **2000**.
97. **Pennisi M.G., Reale S., Giudice S.L., Masucci M., Caracappa S., Vitale M., Vitale F.** : Real time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Veterinary Research*. Vol. 29, pag. 301-303, **2005**.
98. **Plevraki K., Koutinas A.F., Kaldrymidou N., Papazoglou L.G., Saridomichelakis M.N., Savvas I., Leonidas L.** : Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol. 20, pag. 228-233, **2006**.
99. **Polzin J.D.** : Chronic kidney disease. In: Bartages J., Polzin J.D. : *Nephrology and Urology of Small Animals*. First edition, Wiley-Blackwell, Iowa, cap. 48, pag. 433-471, **2011**.
100. **Pressler B.** : Nephrotic syndrome. In: In: Bartages J., Polzin J.D. : *Nephrology and Urology of Small Animals*. First edition, Wiley-Blackwell, Iowa, cap. 44, pag. 415-421, **2011**.
101. **Pumarola M., Brevik L., Badiola J., Vargas A., Domingo M., Ferrer L.** : Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 105, pag. 279-286, **1991**.
102. **Rallis T., Day M.J. , Saridomichelakis M.N., Adamama-Moraitou K.K., Papazoglou L., Fytianou A. and Koutinas A.F.:** Chronic hepatitis associated with canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 Cases. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 132, pag. 145-152, **2005**.
103. **Reis A.B., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Mayrink W., Franca_Silva J.C., Giunchetti R.C., Genaro O., Correa-Oliveira R.:** Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspect of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*. Vol. 81, pag. 68-75, **2006a**.
104. **Reis A.B., Teixeira-Carvalho A., Vale A.M., Marques M.J., Giunchetti R.C., Mayrink W., Guerra L.L., Andrade R.A., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho O.A.** : Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 112, pag. 102-116, **2006b**.

105. **Reis A.B., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Giunchetti R.C., Carneiro C.M., Mayrink W., Tafuri W.L., Correa-Oliveira R.** : Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and Immunopathology*. Vol. 128, pag. 87-95, **2009**.
106. **Rosypal A.C., Troy G.C., Zajac A.M., Frank G., Lindsay D.S.** : Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagles. *Journal of Parasitology*. Vol.91, pag. 970-972, **2005**.
107. **Saridomichelakis M.**: Advanced in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implication. In: *Veterinary Dermatology*. Vol. 20, pag 471-489, **2009**.
108. **Sasanelli M., Paradies P., de Caprariis D., Greco B., De Paolo P., Palmisano D., Carelli G.** : Acute- phase proteins in dogs naturally infected with leishmaniosis infantum during and after long term therapy with allopurinol. *Veterinary Research Communications*. Vol. 31, pag. 335-338, **2007**.
109. **Sbrana S., Mancianti F., Marchetti V.** : Artropatie in cani affetti da leishmaniosi. In: *Atti del 2° Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi canina*. Pisa, pag. 164-166, **2010**.
110. **Scalone A., Luna R., Oliva G., Baldi L., Satto G., Vesco G., Mignone W., Turilli C., Mondesire R., Simpson D., Doroghue A., Frank G., Gradoni L.** : Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen on a diagnostic marker for canine leishmaniosis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*. Vol. 104, pag. 275-285, **2002**.
111. **Silva L.F., Oliveira R.G., Silva T.M.A., Xavier M.N., Nascimento F.E., Santos R.L.**: Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. In: *Veterinary Parasitology*. Vol. 160, pag. 55-59, **2009**.
112. **Sisto M., Brandonisio O., Panaro M.A., Acquafredda A., Leogrande D., Fasanella A., Trotta T., Fumarola L., Mitolo V.**: Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. In: *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious disease*. Vol. 24, pag. 247-254, **2001**.
113. **Solano-Gallego L., Koutinas A., Miró G., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G.** : Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. Vol. 165, pag. 1-18, **2009**.
114. **Solano-Gallego L., Miró G., Koutinas A., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G.** : LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites e Vectors*. Vol. 20, pag. 1-16, **2011**.

- 115.**Slappendel R.J.** : Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *The Veterinary quarterly*. Vol. 10, pag. 1-16, **1988**.
- 116.**Stockham S.L., Scott M.A.** : Proteins. In : Stockham S.L., Scott M.A. : *Foundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. II ed., Blackwell Publishing, Iowa, cap. 7, pag. 369-414, **2008**.
- 117.**Sundar S., Rai M.** : Advances in the treatment of leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Disease*. Vol. 14, pag. 593-598, **2002**.
- 118.**Thomas J.S.** : Overview of plasma proteins. In Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C., *Schalm's Veterinary Hematology*. V ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pennsylvania, cap. 134, pag. 891-898, **2000a**.
- 119.**Torrent E., Leiva M., Segalès J., Franch J., Peña T., Cabrera B., Pastor J.** : Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *The Journal of Small Animal Practice*. Vol. 46, pag. 549-552, **2005**.
- 120.**Turrel J.M., Pool R.** : Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis. *American Veterinary Radiology Journal*. Vol. 23, pag. 243-249, **1982**.
- 121.**Vaden S.L., Grauger F.** : Glomerular disease in nephrology and urology of small animals. In: Bartages J., Polzin J.D. : *Nephrology and Urology of Small Animals*. First edition, Wiley-Blackwell, Iowa, cap. 53, pag. 538-546, **2011**.
- 122.**Valera F.** : Immunopatología de la leishmaniosis canina: bases teóricas y aspectos práctico. *Premios fundacion Purina*. Columna Ediciones S.A., pag. 11-54, **1992**.
- 123.**Vamvakidis C.D., Koutinas A.F., Kanakoudis G., Georgiadis G., Saridomichelakis M.** : Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *The Veterinary Record*. Vol. 146, pag. 698-703, **2000**.
- 124.**Viñuelas J., García-Alonso M., Ferrando L., Navarrete I., Molano I., Mirón C., Carcelén J., Alonso C., Nieto C.G.** : Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. Vol.101, pag. 23-27, **2001**.
- 125.**Vouldoukis I., Bécherel P.A., Riveros-Moreno V., Arock M., da Silva O., Mazier D., Mossolayi M.D.** : Interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *European Journal of Immunology*. Vol. 27, pag. 936-940, **1997**.
- 126.**Zatelli A., Borgarelli M., Santilli R., Bonfanti U., Nigrisoli E., Zanatta R., Tarducci A., Guaracci A.** : Glomerular lesion in dogs infected with *Leishmania* organisms. *America Journal Veterinary Research*. Vol. 64, pag. 558-561, **2003**.

127. **Zatelli A.** : Gestione terapeutica del paziente leishmaniotico nefropatico. In: *Atti del 2° Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi canina*. Pisa, pag. 94-99, 2010.