

# Leishmaniosi Canina aggiornamenti su diagnosi e terapia. Parte I: approccio diagnostico

## RIASSUNTO

Dalla prima edizione delle linee guida sulla diagnosi di leishmaniosi, avvenuta nel 2007, è stata pubblicata una grossa mole di lavori sulla leishmaniosi. Alcuni di questi lavori presentano aspetti innovativi da un punto di vista metodologico o aggiungono informazioni importanti su alcuni aspetti specialistici (es. istopatologia, biologia molecolare), ma di fatto la gran parte degli studi, non fa che confermare quanto già presentato nella prima versione delle linee guida. Nonostante la messa a punto di nuovi antigeni o metodi di rilevazione per i test sierologici, tutto sommato la scelta del metodo da utilizzare dipende dalla presentazione clinica, dallo scopo per cui il test viene eseguito (es. screening o diagnostica) e da situazioni epidemiologiche più che da un'effettiva differenza nella resa diagnostica dei diversi test, come già sottolineato nella versione originale delle linee guida. Gli unici elementi di rilievo sono rappresentati dalla possibilità di utilizzare campioni prelevabili con metodiche non invasive quali le urine e i tamponi congiuntivali (questi ultimi in particolare hanno sensibilità e accuratezza diagnostica sovrapponibile ai campioni tradizionali). L'evidenziazione di *Leishmania* in questi campioni può essere utile per diagnosticare l'infezione, per la formulazione della prognosi (es. associazione tra *Leishmania* nelle urine e gravità del danno renale) o per monitorare nel tempo la progressione dell'infezione in animali esposti all'infezione (es. positivizzazione dei tamponi congiuntivali).

## A CURA DEL GRUPPO DI STUDIO SULLA LEISHMANIOSI CANINA (G.S.L.C.)

**Saverio Paltrinieri<sup>1</sup>, Alessandra Fondati<sup>2</sup>, George Lubas<sup>3</sup>, Luigi Gradoni<sup>4</sup>, Alberto Crotti<sup>5</sup>, Gaetano Oliva<sup>6</sup>, Michele Maroli<sup>7</sup>, Xavier Roura<sup>8</sup>, Andrea Zatelli<sup>9</sup>, Eric Zini<sup>10</sup>**

<sup>1</sup> Prof., DVM, PhD, Dipl ECVCP, Dipartimento di Patologia Animale Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano, Via Celoria 10, Milano (I)

<sup>2</sup> Dr., DVM, PhD, Dipl ECVDP, libero professionista, Padova-Roma (I)

<sup>3</sup> Prof., DVM, Dipl ECVIM-CA Internal Medicine, Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa, Via Livornese, lato monte, San Piero a Grado, Pisa (I)

<sup>4</sup> Dr., BSc, PhD, Dirigente di Ricerca, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Reparto di Malattie trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, Roma (I)

<sup>5</sup> Dr., DVM, Studio Veterinario Associato, Via P. Revelli Beaumont 43, Genova (I)

<sup>6</sup> Prof., DVM, Ordinario di Clinica Medica Veterinaria, Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università di Napoli Federico II, Via Federico Delpino 1, Napoli (I)

<sup>7</sup> Dr., BSc, PhD, già Dirigente di Ricerca, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Reparto di Malattie trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, Roma (I)

<sup>8</sup> Dr., DVM, PhD, Dipl ECVIM-CA, Hospital Clinic Veterinari, Universitat Autònoma de Barcelona (E)

<sup>9</sup> Dr., DVM, Clinica Veterinaria Pirani, Via Majakowski 2/L,M,N, Reggio Emilia (I)

<sup>10</sup> Dr., DVM, PhD, Dipl ECVIM-CA, Clinic for Small Animal Internal Medicine, University of Zurich, Winterthurerstrasse 260, Zurich, Svizzera (CH)

## INTRODUZIONE

Dato che la letteratura scientifica dimostra che molti campi di ricerca, tra i quali lo studio della leishmaniosi, sono in continua evoluzione, a quattro anni di distanza dalla pubblicazione delle linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione (approccio diagnostico),<sup>1</sup> il Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina (GSLC) ha provveduto a una prima revisione della letteratura riguardante la diagnostica della leishmaniosi canina (LCan), in maniera da poter eventualmente modificare le stesse linee guida nel caso nel periodo Gennaio 2007 - Dicembre 2010 fossero emerse novità importanti.

## REVISIONE DEI LAVORI PUBBLICATI NEL PERIODO 2007-2010

Analogamente alla stesura delle prime linee guida sulla LCan relative alla diagnosi la revisione sistematica della letteratura è stata basata su una ricerca bibliografica condotta su PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), utilizzando la seguente strategia per le parole chiave ("canine leishmaniasis" OR "canine leishmaniosis" OR (dog AND leishmania)) AND (diagnosis OR serology OR antibody\* OR PCR OR (anemia OR anaemia) OR gammopathy OR electrophoresis OR cytology OR bone marrow OR immunohistochemistry).

Questa ricerca ha identificato 294 lavori, 26 dei quali non sono stati presi in considerazione in quanto non incentrati sulla LCan (es. studi su specie diverse dal cane o studi nei quali però la leishmaniosi rappresentava un criterio di esclusione).

I lavori strettamente inerenti la LCan pubblicati nel periodo sopra citato e recuperabili da PubMed utilizzando le parole chiave sopra men-

<sup>1</sup> "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 19/04/2011 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 19/04/2011".

zionate erano quindi 268. Da questo elenco di lavori sono poi stati esclusi:

- gli studi incentrati non tanto sulle caratteristiche o sulle prestazioni dei diversi metodi diagnostici quanto sull'utilizzo di mezzi diagnostici nell'ambito di studi epidemiologici o sull'infezione di insetti vettori (81 lavori);
- gli studi in cui i diversi metodi diagnostici sono stati utilizzati nell'ambito di studi patogenetici o focalizzati sull'immunologia della LCan, spesso anche ai fini di valutazione preliminare dell'efficacia di vaccini (77 lavori);
- gli studi in cui i diversi metodi diagnostici sono stati utilizzati per il monitoraggio dell'efficacia o della sicurezza dei farmaci o di trattamenti preventivi nei confronti delle punture di flebotomi (20 lavori);
- le rassegne bibliografiche sulla leishmaniosi (review) (21 lavori);
- le segnalazioni di singoli o pochi casi (case report) (10 lavori).

Questo lavoro di selezione ha limitato a 59 pubblicazioni il materiale bibliografico relativo solamente alla diagnosi di leishmaniosi.<sup>2-60</sup> Sebbene tutti questi lavori siano stati presi in considerazione per il presente aggiornamento, alcuni sono riferiti a situazioni epidemiologiche particolari o sono limitati a un numero ridotto di casi, o fanno riferimento a metodi diagnostici non ancora ampiamente diffusi nei laboratori diagnostici.

Ad eccezione di un singolo lavoro,<sup>18</sup> rivolto alla messa a punto di un test diagnostico basato sulla determinazione cromatografica dei composti volatili nel pelo, i cui risultati sono del tutto preliminari e non permettono di raccomandare tale test nella diagnostica di routine, gli altri studi di diagnostica sono suddivisibili nei seguenti gruppi di argomenti:

- Sierologia: 30 studi sono dedicati alla valutazione delle proprietà diagnostiche dei metodi sierologici tradizionali o alla messa a punto di nuovi approcci sierologici.
- Diagnostica molecolare: 14 studi sono dedicati alla valutazione di test molecolari (PCR tradizionali o quantitative), valutate sia dal punto di vista metodologico (es. messa a punto di nuovi approcci molecolari, rese diagnostiche dei test tradizionali), sia dal punto di vista dell'applicabilità dei test PCR a campioni biologici non convenzionali come urine e tamponi congiuntivali.
- Clinica/patologia/patologia clinica: 14 lavori sono stati dedicati alla descrizione di aspetti clinici, istopatologici o clinico-patologici di forme di leishmaniosi a diversa localizzazione (es. splenica, intestinale, oculare, ecc.).

Di seguito, sono riassunti i risultati principali di questi lavori, divisi per gruppi come sopra citato, con l'eccezione del singolo studio sulla cromatografia già menzionato, per poi valutare l'impatto dei lavori stessi sulle linee guida pubblicate nel 2007.

## RASSEGNA DEI RISULTATI PUBBLICATI NEL PERIODO 2007-2010

### Sierologia

Molti degli studi svolti nel periodo in oggetto (vedi Box 1) sono stati dedicati alla ricerca di nuovi approcci sierologici, attraverso l'identificazione di potenziali antigeni di leishmania e/o alla ricerca nel siero di cane anticorpi verso questi nuovi antigeni con cui allestire e validare nuovi test. In ultima analisi, questi studi hanno permesso di trarre informazioni importanti sul tipo di anticorpi presenti in cani infetti e hanno generato test potenzialmente utili come future alternative ai test tradizionali, anche se nella gran parte dei casi i risultati pubblicati non consentono di raccomandare su larga scala l'uso di questi test nella diagnostica di routine.

Altri lavori sono stati rivolti alla messa a punto di nuovi test sierologici e/o alla validazione dei test già esistenti in commercio. In linea di massima anche questo gruppo di studi ha affrontato la diagnostica della leishmaniosi soprattutto da un punto di vista tecnico-analitico ma nella gran parte dei casi non ha fornito informazioni immediatamente applicabili alla diagnostica di routine, ad eccezione degli studi relativi alla validazione di test già in commercio.

Altri studi hanno confrontato tra loro le prestazioni diagnostiche di test basati su principi analitici diversi, rilevando, in particolare, buone prestazioni del metodo IFAT ma variabili livelli di concordanza tra i diversi test commerciali e in particolare tra IFAT ed ELISA da un lato e test immunocromatografici dall'altro.

Infine, alcune pubblicazioni hanno valutato aspetti prognostici dei test sierologici rilevando una buona correlazione tra peggioramento clinico e titoli sierologici nel sangue e un potenziale ruolo prognostico del rilievo di IgA nelle urine.

### Diagnostica molecolare

Anche nel caso delle tecniche molecolari (vedi Box 2) alcuni studi sono prettamente metodologici (messa a punto di metodiche, prestazioni analitiche e diagnostiche di tecniche di PCR) tesi a rendere più rapide o specifiche le procedure diagnostiche sia utilizzando la PCR convenzionale sia metodi di PCR quantitativa.

Altri studi hanno esaminato le capacità diagnostiche di metodi di PCR in diversi campioni biologici: oltre a perfezionare gli studi sulle prestazioni della PCR su sangue e midollo sono state indagate le potenzialità dell'applicazione della PCR su urine e su tamponi congiuntivali.

### Aspetti clinici, patologici e clinicopatologici

In questo gruppo di studi sono stati descritti nel dettaglio alcuni aspetti delle lesioni associate a lei-

**BOX 1**

**Studi pubblicati nel periodo Gennaio 2007 - Dicembre 2010 relativi allo sviluppo di nuovi test sierologici o all'applicazione di test sierologici già esistenti**

<b>Nuovi approcci sierologici (identificazione di potenziali antigeni)</b>	Messa a punto di un ELISA e di una metodica di intradermoreazione verso la cisteina proteinasi di <i>Leishmania</i> . Tali test rilevano i cani infetti e discriminano forme cliniche e subcliniche. <sup>42</sup>
	Messa a punto di un ELISA per l'enzima citosolico LicTXNPx ( <i>Leishmania infantum</i> cytosolic trypanredoxin peroxidase). Tale test, associato ai classici ELISA permette di migliorare l'individuazione dei cani infetti. <sup>47</sup>
	Messa a punto di un ELISA verso KMPII (kinetoplastid membrane protein-11), TRYP (trypanredoxin peroxidase) e LACK (Leishmania homologue of receptors for Activated C Kinase), antigeni di <i>Leishmania</i> che inducono una intensa produzione di anticorpi nei cani infetti. <sup>55</sup> Alcuni di questi test possono essere utili in sede di monitoraggio della malattia durante le terapie dato che tali anticorpi scompaiono molto rapidamente nei cani che rispondono alle terapie. <sup>54</sup>
	Sviluppo di test sierologici, basati su tecnologie diverse, per rilevare antigeni di secrezione quali i TESA (trypomastigote excreted-secreted antigen), <sup>58</sup> SOD (superossido dismutasi) <sup>34</sup> o altri esoantigeni. <sup>44</sup> Tali test usati in associazione ai test tradizionali aumentano la possibilità di identificare i cani infetti.
	Sviluppo di test contro antigeni ribosomiali di <i>Leishmania</i> . Tali test sembrano più utili dei test tradizionali nell'evidenziazione di cani con sintomatologia poco evidente. <sup>12</sup>
	Sviluppo di un test di agglutinazione diretta contro antigeni strutturali di <i>Leishmania</i> . <sup>53</sup>
	Sviluppo di una proteina ricombinante composta da epitopi diversi di <i>Leishmania</i> e messa a punto di un ELISA che ha prestazioni diagnostiche sovrapponibili all'IFAT o a ELISA commerciali. <sup>8</sup>
	Messa a punto di tecniche di immunoblotting per caratterizzare antigeni in grado di distinguere tra loro le diverse specie di leishmania, soprattutto diffuse nel continente americano, <sup>59,60</sup> dato che la metodica IFAT tradizionale non distingue le specie di <i>Leishmania</i> o <i>Leishmania</i> da <i>Tripanosoma cruzi</i> . <sup>57</sup>
<b>Messa a punto di nuovi test sierologici e/o validazione dei test già esistenti in commercio</b>	Validazione analitica e diagnostica di test commerciali (ELISA o immunocromatografia). <sup>16,23,30</sup> I test validati hanno mostrato buone caratteristiche analitiche (ripetibilità, riproducibilità, linearità) e prestazioni simili a quelle di IFAT o ELISA già validate
	Sviluppo di un metodo in grado di evidenziare diverse classi di IgG: la ricerca simultanea di IgG <sub>1</sub> e IgG <sub>2</sub> può migliorare le informazioni diagnostiche in alcune forme di leishmaniosi del continente americano. <sup>45</sup>
	Ricerca di anticorpi anti- <i>Leishmania</i> mediante citofluorimetria: dopo incubazione del siero dei cani in esame con amastigoti o promastigoti, vengono aggiunti anticorpi fluorescenti anti-IgG di cane. L'uso di amastigoti ha permesso di ottenere rese diagnostiche simili a quelle di altri test sierologici. <sup>50</sup> L'uso di promastigoti sembra invece utile per differenziare le infezioni spontanee dalle sieropositività vaccinali. <sup>5,17</sup> In citofluorimetria è anche possibile differenziare leishmaniosi e sporotricosi. <sup>48</sup>
<b>Confronto delle prestazioni diagnostiche di test basati su principi analitici diversi</b>	Tra i metodi ELISA, quello classico basato sull'antigene k39 fornisce la migliore specificità, ma può avere bassa sensibilità. La sensibilità del metodo può essere aumentata allestendo ELISA con antigeni "crudi" di <i>Leishmania</i> . <sup>10</sup>
	Un test di agglutinazione rapida (fast agglutination screening test o FAST) ha fornito prestazioni superiori a quelli dell'agglutinazione diretta (DAT). <sup>6</sup>
	La concordanza tra i test commerciali più diffusi (IFAT, ELISA e immunocromatografia rapida) è variabile e non sempre elevata <sup>38,46</sup> ed i livelli di positività sono variabili nel tempo. <sup>38</sup> Mentre la concordanza tra IFAT ed ELISA è accettabile, quella tra questi due test e i test rapidi varia in funzione del quadro clinico e della situazione epidemiologica. <sup>21</sup>
	L'IFAT ha rese diagnostiche migliori rispetto all'immunodiffusione su gel, anche se non ha prestazioni ottimali in cani residenti in ambienti con bassa prevalenza di infezione. <sup>3</sup> Il campione ottimale è il siero, mentre l'uso di sangue intero adsorbito su carta da filtro, consigliato per facilitare l'invio dei campioni al laboratorio, può fornire risultati negativi. <sup>24</sup>
<b>Valore prognostico dei test sierologici</b>	Il rilievo di IgA urinarie, che ha un ruolo diagnostico basso, può avere un ruolo prognostico se associato alla valutazione delle IgG urinarie. <sup>56</sup> Queste ultime sono correlate col titolo ematico mentre le IgA, probabilmente prodotte anche localmente, sono correlate con il rapporto proteine:creatinina urinarie.
	All'aggravarsi della malattia corrisponde un innalzamento dei titoli anticorpali (cui si associa una minore risposta alla prova cutanea della leishmanina). <sup>20</sup>

BOX 2

Studi di diagnostica molecolare della leishmaniosi canina pubblicati nel periodo 2007-2010

<p><b>Studi metodologici</b></p>	<p>Sono state analizzate le prestazioni di una metodica di PCR "duplex", che valuta cioè sia l'espressione di DNA di <i>Leishmania</i> che di un gene endogeno (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi o GAPDH), permettendo di riconoscere e minimizzare i falsi negativi. In soggetti con positività ematica al momento della diagnosi, l'applicazione di questo metodo a campioni di sangue raccolti durante il decorso e il trattamento può permettere di rilevare precocemente la negativizzazione.<sup>25</sup></p> <p>È stata valutata l'applicabilità nella diagnostica di routine di un kit rapido commerciale per l'evidenziazione dei prodotti di PCR. Questo approccio rende più semplice e rapida l'esecuzione della PCR e fornisce risultati sovrapponibili a quelli ottenuti con la metodica classica di rilevazione del DNA del kinetoplasto.<sup>11</sup></p> <p>Altri studi hanno riguardato la messa a punto di una PCR quantitativa, da eseguire su campioni di sangue, che mostra buone caratteristiche di sensibilità e accuratezza,<sup>19</sup> ed il confronto tra due metodi diversi di PCR quantitativa, rilevando che il metodo SYBR-GREEN più semplice ed economico, può fornire le stesse prestazioni diagnostiche del più diffuso metodo TaqMan.<sup>15</sup></p>
<p><b>Applicazione della PCR su campioni biologici diversi</b></p>	<p>La PCR tradizionale (kDNA dei micircoli), in linea generale, ha sensibilità ed accuratezza elevate se paragonate all'isolamento del parassita.<sup>26</sup> Se eseguita su sangue, ha invece una moderata sensibilità e specificità rispetto alla sierologia,<sup>37</sup> ma utilizzata in associazione alla sierologia stessa consente di identificare con buona probabilità gli animali malati. Il campione che meglio permette di identificare anche gli animali infetti non malati è il midollo osseo,<sup>32</sup> nel quale le cariche parassitarie, se misurate con PCR quantitativa, sono superiori a quelle ematiche, o della cute, in presenza di lesioni.<sup>43</sup></p> <p>Due studi simili tra loro<sup>33,51</sup> hanno evidenziato che l'esecuzione di PCR quantitative sulle urine permette di rilevare elevate cariche parassitarie in soggetti con lesioni renali evidenti, e/o proteinuria, e/o con ematuria, mentre fornisce risultati bassi o negativi in animali infetti senza lesioni renali o con lesioni renali lievi.</p> <p>È stata valutata l'utilità della PCR su tamponi congiuntivali. I primi studi hanno messo a punto il metodo, identificando il primer ottimale (DNA dei micircoli del kinetoplasto)<sup>41</sup> ed il protocollo di estrazione e amplificazione del DNA.<sup>22</sup> In seguito sono stati pubblicati sia uno studio osservazionale che ha evidenziato una buona sensibilità di tale metodica, rispetto ad altri approcci poco invasivi (PCR su cute e sangue),<sup>29</sup> sia uno longitudinale, che ha rilevato come questa PCR, pur non permettendo una diagnosi particolarmente precoce, tende a positivizzarsi lentamente, ma comunque prima della sieroconversione, in molti dei soggetti campionati ripetutamente nel tempo.<sup>27</sup></p>

shmaniosi a carico di occhi, cute (incluso lesioni ungueali), organi linfoidi, sangue ed altri organi (vedi Box 3).

**AGGIORNAMENTO DELLE LINEE GUIDA DEL GSLC ALLA LUCE DEI NUOVI DATI PUBBLICATI**

Dalla prima edizione delle linee guida sulla diagnosi di leishmaniosi, avvenuta nel 2007, è stata pubblicata una grossa mole di lavori sulla leishmaniosi, e in particolare sulla diagnosi. Alcuni dei lavori pubblicati presentano aspetti innovativi da un punto di vista metodologico o aggiungono informazioni importanti su alcuni aspetti specialistici (es. istopatologia, biologia molecolare), ma di fatto la gran parte degli studi, con alcune eccezioni che verranno elencate in seguito, non fa che confermare quanto già presentato nella prima versione delle linee guida.

Da un punto di vista clinico e patologico sono state fornite informazioni utili per migliorare la classificazione e la caratterizzazione di lesioni già in gran parte conosciute (linfonodali, spleniche, cutanee) e sono state fornite informazioni relativamente nuove circa la possibilità di riscontrare lesioni o infiltrati parassitari in organi o tessuti non tradizionalmente considerati colpiti da leishmania (es. cuore, polmone, intestino, apparato genitale femminile). Gran parte delle segnalazioni relative a queste forme si riferisce ad articoli riferiti a studi svolti in aree endemiche per leishmaniosi. Ciò conferma l'importanza, già sottolineata nel Box 1 delle linee guida originali<sup>1</sup>, di considerare, nelle aree endemiche, anche la possibilità di "altri segni clinici" non classicamente riferibili a LCan. Dal punto di vista delle analisi di laboratorio non sono state fornite informazioni rilevanti circa eventuali alterazioni ematologiche ed ematologiche associate a leishmaniosi, fatta eccezione per il riscontro di anticorpi anti piastrine, la cui ricerca era già stata consigliata come esame di ap-

BOX 3 Studi pubblicati nel periodo 2007-2010 e relativi aspetti clinici, patologici e clinicopatologici	
<b>Occhi</b>	Sono state descritte, in ordine di frequenza, le principali alterazioni oculari associate a leishmaniosi, evidenziando quadri istopatologici molto diversi tra loro, nonché la possibile presenza di amastigoti praticamente in tutti i distretti oculari. <sup>40</sup>
	In uno studio analogo al precedente, l'attenzione è stata rivolta alla muscolatura perioculare, anch'essa spesso caratterizzata da processi infiammatori e da infiltrazione di parassiti. <sup>36</sup>
<b>Cute</b>	Sono stati evidenziati aspetti istopatologici diversi, sia in termini di cellule infiltranti sia in termini di carica parassitaria, in lesioni cutanee di cani provenienti da aree a diversa endemicità. <sup>9</sup>
	Sono stati descritti gli elementi diagnostici che permettono di differenziare le lesioni delle ghiandole sebacee associate a leishmaniosi da quelle dovute ad adenite sebacea idiopatica. <sup>7</sup>
	È stata descritta la possibilità di isolare <i>Leishmania</i> anche da cute integra, in particolare dalle regioni auricolari e scapolari. <sup>31</sup>
	Sono state descritte le caratteristiche istopatologiche delle lesioni ungueali, che risultano caratterizzate da dermatite lichenoidale, a volte associata a dermatite dell'interfaccia e/o a separazione dermo-epidermica, indipendentemente dalla presenza di parassiti intralesionali. <sup>28</sup>
<b>Organi linfoidi</b>	È stata evidenziata una diretta correlazione tra presenza di lesioni cutanee e quantità di amastigoti evidenziati nei linfonodi, sebbene i preparati linfonodali possano risultare immunostochimicamente positivi anche in assenza di lesioni cutanee. <sup>14</sup>
	È stato valutato che in agoaspirati linfonodali è possibile identificare gli amastigoti con colorazioni rapide o con immunocitochimica anche in animali oligo- o asintomatici, seppure con sensibilità inferiore rispetto alla PCR. <sup>35</sup>
	Sono state evidenziate lesioni spleniche associate a leishmaniosi, anche in assenza di segni clinici evidenti, ed è stata evidenziata l'utilità dell'indagine immunostochimica per evidenziare <i>Leishmania</i> in preparati splenici. <sup>52</sup>
<b>Organi vari</b>	Sono state descritte le caratteristiche macroscopiche ed istologiche di lesioni nodulari a livello linguale. <sup>39</sup>
	Sono state descritte forme di colite asintomatica caratterizzate da lesioni piogranulomatose diffuse e ricche di parassiti. <sup>2</sup>
	Sono stati descritti fenomeni di infiltrazione parassitaria cardiaca o polmonare. <sup>4</sup>
	Sono state descritte lesioni dell'apparato genitale femminile caratterizzate principalmente da dermatiti vulvari ma con la possibile presenza di parassiti in diversi tratti dell'apparato genitale femminile. <sup>49</sup>
<b>Sangue</b>	È stata confermata la presenza di anticorpi IgG e IgM anti-piastrine in cani infetti malati e non, riscontro di potenziale utilità clinica-diagnostica. <sup>13</sup>

profondimento nel Box 2 della prima versione delle linee guida<sup>1</sup>.

Per quanto riguarda la diagnosi eziologica diretta ed indiretta, sono state prodotte numerosissime informazioni circa eventuali modifiche dei metodi sierologici mediante purificazione o sintesi di nuovi antigeni e/o mediante la messa a punto di metodi innovativi di rilevazione della positività. Tra questi, di particolare interesse la possibilità di utilizzare, in futuro, delle tecniche citofluorimetriche, che permettono una quantificazione più oggettiva (meno operatore-dipendente) degli anticorpi presenti. Il metodo citofluorimetrico sembra inoltre essere in grado di differenziare i titoli vaccinali da quelli "di campo", anche se tale aspetto non rappresenta un grosso vantaggio in aree geografiche nelle quali la vaccinazione non è disponibile, come è al momento attuale l'Europa. Tutto sommato però, i lavori che hanno descritto queste innovazioni metodologiche, non hanno fornito risultati immediatamente applicabili nella diagnostica di routine. Prima di raccomandare un

estensivo uso di questi metodi innovativi sono quindi necessari ulteriori studi che dimostrino un effettivo vantaggio rispetto ai metodi sierologici tradizionali.

Allo stato attuale, seppur evidenziando diverse sensibilità, specificità e accuratezza diagnostica, tali studi confermano quanto già riportato nelle linee guida sul ruolo diagnostico dei test basati sull'evidenziazione di anticorpi in corso di leishmaniosi.

Lo stesso dicasi per le variazioni delle tecniche di PCR quantitative o tradizionali che sono state proposte in alcuni degli studi presentati in precedenza. Allo stesso modo, gli studi relativi al confronto di metodi diagnostici quali PCR, IFAT, ELISA, immunocromatografia, agglutinazione diretta e coltivazione dei parassiti confermano quanto già presentato nella versione originale delle linee guida circa vantaggi, svantaggi, limiti e potenzialità applicative dei diversi test. In ultima analisi, la conclusione più comune tra i lavori sopra citati è che la scelta del metodo da utilizzare dipende dalla presentazione clinica, dallo scopo per cui il test viene eseguito

(es. screening o diagnostica) e da situazioni epidemiologiche più che da un'effettiva differenza nella resa diagnostica dei diversi test, come già sottolineato nella versione precedente delle linee guida. Gli studi che effettivamente possono aggiungere qualcosa di nuovo al protocollo diagnostico della leishmaniosi presentato nelle linee guida sono quelli relativi alla resa diagnostica di test sierologici o molecolari eseguiti su tessuti diversi da sangue, midollo, linfonodi o organi lesionati, più comunemente usati per la ricerca di *Leishmania* e consigliati nelle linee guida originali come i tessuti di scelta per la diagnosi eziologica. In particolare, sembra essere utile ricorrere alla evidenziazione nelle urine di anticorpi anti-*Leishmania* o della stessa *Leishmania* mediante PCR: tali riscontri appaiono interessanti sia per studi patogenetici sia per valutazioni prognostiche, essendo stato rilevato un certo grado di correlazione tra il riscontro di positività alla PCR o di anticorpi IgG e IgA e l'estensione o la gravità delle lesioni renali. Da un punto di vista strettamente diagnostico la positività all'analisi delle urine non sembra però offrire vantaggi rispetto ai metodi sierologici o molecolari già presentati nella prima versione delle linee guida, dato che le cariche parassitarie sono comunque superiori nei tessuti convenzionalmente campionati che non nelle urine.

Un'altra importante novità nell'approccio alla leishmaniosi è rappresentata dalla possibilità di eseguire PCR su materiale raccolto mediante tamponi congiuntivali. Gli studi metodologici hanno descritto le condizioni di laboratorio per ottenere il massimo della resa diagnostica da questa tecnica. Gli studi di campo hanno evidenziato che, pur essendo un metodo poco o per niente invasivo rispetto agli approcci tradizionali (sangue, midollo, prelievi per ago-aspirazione, ecc.) ha una sensibilità e un'accuratezza diagnostica sovrapponibile a quella ottenibile dai campioni sopra citati e, inoltre, sembra molto utile nella valutazione nel tempo degli animali infetti in quanto si positivizza prima della sieroconversione.

### CONSIDERAZIONI FINALI

In conclusione i lavori pubblicati nel periodo Gennaio 2007 - Dicembre 2010 confermano di fatto quanto già presentato nella versione precedente delle linee guida e, sebbene presentino risultati potenzialmente utilizzabili in futuro per migliorare la resa diagnostica di test eziologici diretti ed indiretti, non introducono elementi di novità nell'approccio diagnostico al paziente potenzialmente leishmaniotico nella pratica clinica.

Gli unici elementi di rilievo sono, infatti, rappresentati dalla possibilità di utilizzare campioni prelevabili con metodiche non invasive quali le urine e i tamponi congiuntivali. L'evidenziazione di *Leishmania* in queste sedi può essere utile non tanto in sede di prima diagnosi, quanto per la formulazione della prognosi (es. associazione tra *Leishmania* nelle urine e gravità del danno renale) o per monitorare nel tempo la progressione dell'infezione in animali esposti all'infezione (es. positività dei tamponi congiuntivali).

### Parole chiave

*Leishmaniosi, cane, linee-guida, diagnosi, aggiornamento.*

## Canine Leishmaniasis update on diagnosis and therapy. Part I: Diagnostic approach

### Summary

The first edition of the guidelines for the diagnosis of canine leishmaniasis (CanL) has been prepared by the "Canine Leishmaniasis Working Group" (CLWG) in 2007. Since then a great number of papers on CanL has been published. Some of them describe innovative methodology aspects, other papers provide further details on specific disease features, such as histopathology and molecular biology. Overall, the studies carried-out on CanL in the period 2007-2010 confirm the diagnostic approach elaborated and published by the CLWG in 2007. Although new *Leishmania* antigens have been obtained and new detection methods for serological test have been set-up, the choice of the diagnostic method remains linked to (i) clinical signs shown by the dog, (ii) aim of the test (i.e. screening or diagnosis), and (iii) local epidemiological conditions, rather than to a diagnostic yield difference of the tests used, as previously suggested in the CLWG guideline. From the literature, the unique important novel finding appears to be represented by the possibility to use samples such as urine and conjunctival swabs that can be easily obtained. Specifically, conjunctival swabs show a diagnostic sensitivity and accuracy similar to traditional samples. Observing *Leishmania* amastigotes in those samples is useful to diagnose the infection, to define the prognosis (e.g. association between urine *Leishmania* amastigotes and severity of renal lesions) or to monitor progression of the infection in exposed dogs (e.g. conjunctival swabs becoming positive).

### Key words

*Leishmaniasis, dog, guidelines, diagnosis, update.*

BIBLIOGRAFIA

1. Castagnaro M, Crotti A, Fondati A, Gradoni L, et al.: Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte I: Approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico. *Veterinaria* 21:19-32, 2007.
2. Adamama-Moraitou KK, Rallis TS, Koytinas AF, Tontis D, et al.: Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with Leishmania infantum: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg* 76:53-57, 2007.
3. Adel A, Saegerman C, Speybroeck N, Praet N, et al.: Canine leishmaniasis in Algeria: true prevalence and diagnostic test characteristics in groups of dogs of different functional type. *Vet Parasitol* 172:204-213, 2010.
4. Alves GB, Pinho FA, Silva SM, Cruz MS, et al.: Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with Leishmania (Leishmania) chagasi. *Braz J Med Biol Res* 43:310-315, 2010.
5. Andrade RA, Silva Araujo MS, Reis AB, Gontijo CM, et al.: Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 128:79-86, 2009.
6. Babakhan L, Mohebbali M, Akhouni B, Edrissian GH, et al.: Rapid detection of Leishmania infantum infection in dogs: a comparative study using fast agglutination screening test (FAST) and direct agglutination test (DAT) in Iran. *Parasitol Res* 105:717-720, 2009.
7. Bardagi M, Fondevila D, Zanna G, Ferrer L: Histopathological differences between canine idiopathic sebaceous adenitis and canine leishmaniosis with sebaceous adenitis. *Vet Dermatol* 21:159-165, 2010.
8. Boarino A, Bollo E, Prunotto L, Canale L, et al.: Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 31:527-536, 2008.
9. Calabrese KS, Cortada VM, Dorval ME, Souza Lima MA, et al.: Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. *Exp Parasitol* 124:253-257, 2010.
10. Carson C, Antoniou M, Christodoulou V, Messaritakis I, et al.: Selection of appropriate serological tests to measure the incidence of natural Leishmania infantum infection during DNA/MVA prime/boost canine vaccine trials. *Vet Parasitol* 162:207-213, 2009.
11. Carson C, Quinell RJ, Holden J, Garcez LM, et al.: Comparison of Leishmania OligoC-Test PCR with conventional and real-time PCR for Diagnosis of canine Leishmania infection. *J Clin Microbiol* 48:3325-3330, 2010.
12. Coelho EA, Ramirez L, Costa MA, Coelho VT, et al.: Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using Leishmania species ribosomal protein extracts. *Clin Vaccine Immunol* 16:1774-1780, 2009.
13. Cortese L, Sica M, Piantodosi D, Ruggiero G, et al.: Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by Leishmania infantum. *Vet Rec* 164:778-782, 2009.
14. Costa MM, Lima WG, Figueiredo MM, Michalick MS, et al.: Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with Leishmania infantum: a histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. *Vet Pathol* 45:613-616, 2008.
15. da Silva RN, Amorim AC, Brandão RM, de Andrade HM, et al.: Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating Leishmania chagasi loads in naturally infected dogs. *Ann Trop Med Parasitol* 104:137-143, 2010.
16. Daprà F, Scalone A, Mignone W, Ferroglio E, et al.: Validation of a recombinant based antibody ELISA for diagnosis of human and canine leishmaniasis. *J Immunoassay Immunochem.* 29:244-256, 2008.
17. de Andrade RA, Reis AB, Gontijo CM, Braga LB, et al.: Clinical value of anti-Leishmania (Leishmania) chagasi IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 116:85-97, 2007.
18. de Oliveira LS, Rodrigues Fde M, de Oliveira FS, Mesquita PR, et al.: Headspace solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry combined to chemometric analysis for volatile organic compounds determination in canine hair: a new tool to detect dog contamination by visceral leishmaniasis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 875:392-398, 2008.

Vorrei...



articolazioni sane!

PERLOQUAN®



**NATURALE**  
Miteli dalle labbra verdi  
Erbe officinali  
Vitamine e minerali  
**APPETIBILE E FACILE  
DA SOMMINISTRARE**  
grazie alla nuova  
Tecnologia PERL



19. de Paiva Cavalcanti M, Felinto de Brito ME, de Souza WV, de Miranda Gomes Y et al.: The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Vet J* 182:356-358, 2009.
20. Dos-Santos WL, Jesus EE, Paranhos-Silva M, Pereira AM, Santos JC, et al.: Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 123:251-259, 2008.
21. Ferreira Ede C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, et al.: Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 146:235-241, 2007.
22. Ferreira Sde A, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS: Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 152:257-263, 2008.
23. Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio 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. *Vet Parasitol* 144:162-6 2007.
24. Figueiredo FB, Madeira MF, Menezes RC, Pacheco RS, et al.: Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet J* 186:123-124, 2010.
25. Franceschi A, Compagnoni F, Mancianti F. A simple duplex-PCR protocol for routine diagnosis and follow up of canine leishmaniasis. *Parassitologia* 49:43-48, 2007.
26. Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, et al.: PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2007;144:234-241.
27. Gramiccia M, Di Muccio T, Fiorentino E, Scalone A, et al.: Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. *Vet Parasitol* 171:223-228, 2010.
28. Koutinas AF, Carlotti DN, Koutinas C, Papadogiannakis EI, et al.: Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniasis associated with *Leishmania infantum*. *Vet Dermatol* 21:572-577 2010.
29. Leite RS, Ferreira Sde A, Ituassu LT, de Melo MN, et al.: PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol* 170:201-206, 2010.
30. Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MA, Reis AB, et al.: Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop* 107:205-207, 2008.
31. Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, et al.: Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci* 87:260-262, 2009.
32. Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, et al.: Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 179:142-144, 2009.
33. Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, et al.: Urine sampling for real-time polymerase chain reaction based diagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest* 20:64-67, 2008.
34. Marin C, Longoni SS, Mateo H, de Diego JA, et al.: The use of an excreted superoxide dismutase in an ELISA and Western blotting for the diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum* naturally infected dogs. *Parasitol Res* 101:801-808, 2007.
35. Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, et al.: Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 145:245-252, 2007.
36. Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X, et al.: Detection of *Leishmania* spp. and associated inflammation in ocular-associated smooth and striated muscles in dogs with patent leishmaniasis. *Vet Ophthalmol* 13:139-143, 2010.
37. Nunes CM, Dias AK, Gottardi FP, De Paula HB, et al.: [Polymerase chain reaction evaluation for canine visceral leishmaniasis diagnosis in dog blood samples]. *Rev Bras Parasitol Vet* 16:5-9, 2007.
38. Otranto D, Paradies P, de Caprariis D, Stanneck D, et al.: Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clin Vaccine Immunol* 16:337-343, 2009.
39. Parpaglia ML, Vercelli A, Cocco R, Zobba R, et al.: Nodular lesions of the tongue in canine leishmaniasis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54:414-417, 2007.
40. Peña MT, Naranjo C, Klaus G, Fondevila D, et al.: Histopathological features of ocular leishmaniasis in the dog. *J Comp Pathol* 138:32-39, 2008.
41. Pilatti MM, Ferreira Sde A, de Melo MN, de Andrade AS: Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Res Vet Sci* 87:255-25, 2009.
42. Pinheiro PH, Pinheiro AN, Ferreira JH, Costa FA, et al.: A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 162:32-39, 2009.
43. Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, et al.: Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop* 111:289-294, 2009.
44. Rajasekariah GH, Cardoso L, Dogcio DA, Martin SK, et al.: A novel exo-antigen-based ELISA for the detection of canine leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 78:616-623, 2008.
45. Ribeiro FC, de O Schubach A, Mouta-Confort E, Schubach TM, et al.: Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. *Vet Parasitol* 148:200-206, 2007.
46. Romero M, López M, Echeverry M, Rivas F. [Canine Visceral Leishmaniasis: diagnostic tests do not detect real state of the infection]. *Rev Salud Publica (Bogota)* 10:290-298, 2008.
47. Santarém N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, et al.: Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 48:1866-1874, 2010.
48. Santiago Mde A, Ribeiro FC, Mouta-Confort E, Nascimento LD, et al.: Differentiation between canine cutaneous and visceral leishmaniasis by the detection of immunoglobulin G specific for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens using flow cytometry. *Vet Parasitol* 154:341-346, 2008.
49. Silva FL, Rodrigues AA, Rego IO, Santos RL, et al.: Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 151:86-90, 2008.
50. Silvestre R, Santarém N, Cunha J, Cardoso L, et al.: Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. *Vet Parasitol* 158:23-30, 2008.
51. Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, et al.: Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol* 147:315-319, 2007.
52. Tasca KI, Buzetti WA, Tenorio Mda S, Paulan Sde C, et al.: [Parasitological, immunohistochemical and histopathological study for *Leishmania chagasi* detection in splenic tissues of dogs with visceral leishmaniasis]. *Rev Bras Parasitol Vet* 18:27-33, 2009.
53. Terán-Angel G, Schallig H, Zerpa O, Rodriguez V, et al.: The direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Biomedica* 27:447-453, 2007.
54. Todolí F, Galindo I, Gómez-Sebastián S, Pérez-Filgueira M, et al.: Dynamics and predictive potential of antibodies against insect-derived recombinant *Leishmania infantum* proteins during chemotherapy of naturally infected dogs. *Am J Trop Med Hyg* 82:795-800, 2010.
55. Todolí F, Pérez-Filgueira M, Galindo I, Gómez-Sebastián S, et al.: Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMPII, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. *Vet Parasitol* 164:154-161, 2009.
56. Todolí F, Solano-Gallego L, Ojeda A, Quintana J, et al.: Anti-*Leishmania* IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol* 159:17-23, 2009.
57. Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, et al.: *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 164:118-123, 2009.
58. Umezawa ES, Souza AI, Pinedo-Cancino V, Marcondes M, et al.: TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. *Acta Trop* 111:15-20, 2009.
59. Vale AM, Fujiwara RT, da Silva Neto AF, Miret JA, et al.: Identification of highly specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* species by antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs. *Zoonoses Public Health* 56:41-48, 2009.
60. Zanini MS, Viana KF, Reis AB, Campos DR, et al.: *Leishmania (Viannia) braziliensis*: immunoblotting analysis for the detection of IgG subclasses in the diagnosis of symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 173:143-146, 2010.