

# **Studio retrospettivo longitudinale sull'incidenza e la progressione dei segni clinici in cani "naïve" naturalmente infetti da *Leishmania infantum***

**V. Foglia Manzillo<sup>1</sup>, T. Di Muccio<sup>2</sup>, S. Cappiello<sup>1</sup>, A. Scalone<sup>2</sup>, R. Papparcone<sup>1</sup>, E. Fiorentino<sup>2</sup>, M. Gizzarelli<sup>1</sup>, M. Gramiccia<sup>2</sup>, L. Gradoni<sup>2</sup>, G. Oliva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà Federico II, Napoli, Italy, <sup>2</sup> Dipartimento MIPI, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy

## **Scopo**

Il presente lavoro ha come obiettivo di valutare la progressione dell'infezione leishmanica e l'incidenza dei segni clinici e delle alterazioni clinico-patologiche in cani "naive" giovani, sottoposti ad infezione naturale in un sito ad elevata endemia.

## **Materiali e metodi**

Lo studio è di tipo retrospettivo, longitudinale, basato su un campione di 329 cani "naive" di sesso e razze diverse, appartenenti a quattro diversi studi (A, B, C, D) originariamente rivolti alla valutazione dell'efficacia di prodotti vaccinali. I cani sono stati esaminati periodicamente per 22 mesi (due stagioni consecutive di trasmissione), attraverso l'esecuzione di prove parassitologiche (nested-PCR su aspirato midollare; coltura da linfonodo), sierologiche (immunofluorescenza indiretta) e cliniche (esame clinico, esame emocromocitometrico, profilo ematobiochimico). I cani non sono mai stati trattati con prodotti repellenti anti-flebotomo.

## **Risultati**

Le alterazioni riscontrate con una maggiore incidenza, rilevate 12 mesi dopo l'infezione, sono l'aumento di volume dei linfonodi ed il dimagrimento; i segni cutanei sono stati rilevati, con una frequenza molto bassa, circa 18 mesi dopo l'infezione. I segni oculari sono stati evidenziati in pochi casi e molto tardivamente. La maggior parte delle alterazioni clinico-patologiche è apparsa dopo 12 mesi, mentre in alcuni casi la piastrinopenia e un lieve grado di anemia non rigenerativa sono apparsi già dopo 6 mesi.

## **Conclusioni**

Il nostro studio indica che l'infezione naturale da *Leishmania infantum* presenta un modello comune nella comparsa e nella progressione dei segni clinici durante i due anni successivi all'infezione, indipendentemente dalla razza coinvolta e dalla situazione epidemiologica rilevabile.

# Sierodiagnosi di *Leishmania infantum* nel cane: SPEED LEISH K (BVT group Virbac) a confronto con IFAT e WB

**E. Ferroglio<sup>1</sup>, S. Zanet<sup>1</sup>, W. Mignone<sup>2</sup>, M. Poggi<sup>3</sup>, A. Trisciuglio<sup>1</sup>, P. Bianciardi<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Università di Torino, Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Torino, Italy, <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Val d'Aosta. Sezione d'Imperia, Imperia, Italy, <sup>3</sup> DVM, Imperia, Italy, <sup>4</sup> DVM, Milano, Italy

## Scopo

Un' accurata e rapida diagnosi rappresenta lo strumento principale per gestire in modo efficace i casi clinici di *Leishmania infantum* nel cane. La sierodiagnosi, è attualmente il primo step diagnostico in caso di sospetto clinico. Diversi test rapidi, insieme all'IFAT sono i metodi più comunemente utilizzati sia per studi di ricerca epidemiologici che nella pratica clinica (Scalone et al., 2002, Vet. Parasitol. 104: 275-285). Se il risultato dell'immunofluorescenza indiretta è da considerarsi inequivocabile a diluizioni <1:40 (negativo) o maggiore/uguale a 1:160 (positivo), è invece ambiguo per quei sieri reattivi a diluizioni comprese tra 1:80 e 1:40 (Ferroglio et al., 2002, Parassitologia. 44 (Suppl): 64). Il Western Blot (WB) è stato dimostrato essere più sensibile dell'IFAT (Aisa et al., 1998, Am. J. Trop. Med. Hyg. 58: 154-159; Fernandez-Perez et al., 1999, J. Vet. Diagn. Invest. 11: 170-173 ), ma il suo utilizzo è limitato alla ricerca scientifica e alla validazione di altre tecniche diagnostiche (Ferroglio et al., 2007, Vet. Parasitol. 144: 162-166 ). Considerata la necessità di strumenti diagnostici rapidi ma altrettanto sensibili, la capacità diagnostica di un test rapido, di tipo immunocromatografico (Speed Leish K®, BVT groupe VIRBAC, la Seyne sur Mer, Francia), è stato messa a confronto con quelle di IFAT e WB nella ricerca di anticorpi anti *Leishmania infantum* nel cane.

## Materiali e metodi

Sono stati inclusi nello studio ed è stato prelevato il sangue di 250 cani, di cui 125 IFAT negativi per *L. infantum*, e 125 positivi. Di questi, 81 IFAT positivi anche a diluizioni elevate, e 44 positivi solo a basse diluizioni (1:40-1:80). Ognuno di questi campioni è stato testato in parallelo con WB e Speed Leish K®.

## Risultati

Sensibilità e specificità di Speed Leish K® su sieri IFAT >1:160 o <1:40 sono state rispettivamente del 96,3% (95%CI= 92,18-100%) e 100% (95%CI= 100-100%). Su sieri IFAT reattivi a diluizioni 1:40 o 1:80, il WB è stato usato come test di riferimento, e i valori risultanti di sensibilità e specificità per Speed Leish K®, sono stati del 93,75% (95%CI= 81,88-100%) e 100% (95%CI= 100-100%) per i sieri positivi a 1:80; mentre su campioni positivi a 1:40 sensibilità e specificità sono state del 73,33% (95%CI= 28,08-78,88%) e 100% (95%CI= 100-100%).

## Conclusioni

Il test rapido Speed Leish K® si è dimostrato strumento valido nel diagnosticare correttamente l'infezione da *L. infantum* oltre che nei soggetti inequivocabilmente positivi o negativi all'immunofluorescenza indiretta, anche in quei soggetti la cui risposta anticorpale era minima (IFAT 1:40-1:80). Come dimostrato da Sagols et al., (Proceeding of the 2012 BSAVA Congress, Birmingham, UK), il test rapido esaminato non cross-reagisce con gli anticorpi stimolati dal vaccino LiESP/QA-21. Pertanto si può considerare il test Speed Leish K® come uno strumento valido sia per la diagnosi clinica che per indagini epidemiologiche.

# Indagine sulla sieroprevalenza di Leishmaniosi in cani sani regolarmente medicalizzati che vivono in paesi europei endemici

**E. Sagols<sup>1</sup>, D. Marciat<sup>2</sup>, J. Morlet<sup>1</sup>, D. McGahie<sup>2</sup>, N. Rizzi<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Bvt Groupe Virbac, La Seyne Sur Mer, France, <sup>2</sup> Virbac, Carros, France, <sup>3</sup> Virbac, Milano, Italy

## Obiettivi dello studio

In Europa, la leishmaniosi canina (CanL) colpisce principalmente i cani che vivono attorno al bacino del Mediterraneo (Solano-Gallego et al. *Vet Parasitol* 2009; 165:1–18). Lo scopo di questo studio è valutare la sieroprevalenza di CanL nei cani sani nei principali Paesi europei endemici.

## Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su cani sani, di età superiore ai 6 mesi, che si recavano dal veterinario per esami di routine e che non erano mai risultati positivi a test sulla Leishmania. I cani non avevano mai ricevuto nessuna iniezione di vaccino contro *Leishmania infantum*. L'uso di repellenti e l'età erano registrati, quando possibile. Ad ogni ambulatorio era chiesto di annotare l'incidenza percepita di CanL nella zona.

Tutti i cani inclusi sono stati sottoposti a un test sierologico rapido Speed Leish K® (BVT, France) (Chêne et al. *Scivac Congress*, Pisa, 2010). I campioni positivi sono stati confermati mediante IFAT.

## Risultati

Sono stati testati in totale 981 cani: Spagna (255), Grecia (197), Italia (164), Portogallo (198), Francia (167). Il titolo IFAT era di almeno 1/80 nel 4,7% (46/981) dei cani.

Dei 46 sieropositivi e 935 cani sieronegativi, rispettivamente 11 (23,9%) e 479 (51,2%) avevano usato in modo corretto prodotti repellenti.

La sieroprevalenza globale differiva seconda del Paese e era del 5,5%, 8,1%, 4,9%, 2% e 2,4% in rispettivamente Spagna, Grecia, Italia, Portogallo e Francia. Nelle aree fortemente endemiche, la sieroprevalenza raggiunge fino all'8,1%, 14,6% e 5,8% in rispettivamente Spagna, Grecia e Italia.

Su 970 cani, la sieroprevalenza seconda l'età era di 3,4%, 3,7% e 6,6% per rispettivamente cani <2 anni (294), cani tra 2 e 5 anni (298) e cani >5 anni (378). I cani di età superiore a 5 anni avevano una probabilità significativamente più elevata di essere sieropositivi rispetto a gli altri ( $p=0,031$ ).

L'utilizzo di repellenti era noto per 582 cani. Dei 490 cani trattati correttamente, il 97,8% era sieronegativo e il 2,2% era sieropositivo. Dei 92 cani non trattati, il 96,7% era sieronegativo e il 3,3% era sieropositivo. La riduzione del rischio legata all'utilizzo di repellenti era di 1,47 (odds ratio). La differenza tra i gruppi non era significativa ( $p=0,47$ ).

## Conclusioni

Lo studio mostra che la sieroprevalenza di *L. infantum* in una popolazione sana di cani medicalizzati è di quasi il 5% nei principali Paesi europei interessati. La sieroprevalenza, però, aumenta con esposizioni ripetute durante le stagioni di trasmissione, come evidenziato dalla maggiore prevalenza nei cani più anziani.

Dei cani positivi, il 23,9% era trattato con prodotti repellenti, evidenziando una riduzione del rischio di sieroconversione di circa 1,5 volte, simile a quello riferito da Cortes et al (*Vet Parasitol* 2012; 189:189–96). Sebbene gli insetticidi rappresentino un importante metodo di prevenzione per proteggere i cani contro la CanL, da soli non risultano sufficienti.

Il nuovo vaccino CaniLeish® (Virbac, France) può ridurre il rischio di leishmaniosi clinica di circa 4 volte (EPAR – Public assessment report – [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). I dati presentati confermano la necessità di effettuare nei Paesi endemici uno screening di routine prima del ciclo vaccinale.

# Diffusione della leishmaniosi e presenza di *Phlebotomus* spp. nella provincia di Rieti

**G. Barlozzari**<sup>1</sup>, **C. De Liberato**<sup>1</sup>, **A. Magliano**<sup>1</sup>, **P. Rombola**<sup>1</sup>, **G. Poglayen**<sup>2</sup>, **G. Macri**<sup>1</sup>, **M. Scarpulla**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma, Italy, <sup>2</sup> Università degli Studi di Bologna, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie., Bologna, Italy

## Scopo

La leishmaniosi è una zoonosi con incidenza di circa 200 casi umani l'anno per la forma viscerale (LV) e 300 per la forma cutanea (LC) (Seimenis et al, 2006, Ann Ist Super Sanità, 42: 437-44). Il cane è l'unico serbatoio di rilevanza epidemiologica in Italia. Negli ultimi anni si è assistito alla diffusione della leishmaniosi nella popolazione canina (LCan) in aree ritenute precedentemente indenni (Maroli et al, 2008, Trop Med Int Health, 13: 256-264; Baldelli et al, 2011, Vet Parasitol 179: 57-61; Poglayen et al, 1997, Acta Parasitol Turc, 21: 143). Questo fenomeno sembra associato alla diffusione ed accresciuta mobilità della popolazione canina in sinergia con le mutate condizioni climatico-ambientali che avrebbero permesso ai vettori di colonizzare aree sino a pochi anni or sono non idonee allo sviluppo e all'attecchimento di popolazioni stabili di flebotomi. Nel presente studio si è cercato di valutare la presenza e la diffusione della leishmaniosi nel cane e nell'uomo e la presenza di *Phlebotomus* spp. nella provincia di Rieti che, per caratteristiche geografiche e climatico-ambientali, in alcune zone poco sembra prestarsi al ciclo di questa malattia.

## Materiali e metodi

Sono stati raccolti i seguenti dati: (i) casi sierologicamente confermati di LCan pervenuti nel 2006-2011 (IZSLT Sede Centrale); (ii) casi di LV e LC in pazienti residenti in provincia di Rieti nel 2000-2011 (Agenzia di Sanità Pubblica - ASP - regione Lazio); (iii) stazioni meteo Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione dell'Agricoltura del Lazio (ARSIAL) disponibili sul territorio. La sieroprevalenza di LCan è stata calcolata considerando al numeratore i casi sierologicamente confermati e al denominatore la popolazione canina presente in anagrafe [(sieropositivi/popolazione canina ACIRL)\*100]. La definizione di caso sierologicamente confermato di LCan è stata stabilita secondo la D.G.R. 473/2010 (titolo IFI  $\geq$  1/160). Per individuare i siti più idonei alla cattura dei flebotomi è stato assegnato ai comuni un punteggio in base a prevalenza di LCan, presenza di LV o LC e presenza di stazioni ARSIAL selezionando comuni a più elevato punteggio. Trappole adesive e luminose sono state posizionate (Luglio-Ottobre 2012) in allevamenti zootecnici entro un'area di 5 km dalle stazioni ARSIAL; le catture sono state effettuate con cadenza quindicinale.

## Risultati

I dati raccolti sono stati rappresentati su mappe tramite ArcGIS 9.3. La prevalenza della LCan nei comuni nel 2006-2011 varia da 0,00 % a 7,69 %. Nel 2000-2011 sono stati notificati 6 casi di LV in pazienti residenti nel comune di Rieti e in comuni del Mirtense e del Salario. Sono stati raccolti 828 esemplari della famiglia Phlebotominae, 508 maschi, 309 femmine e 11 esemplari di sesso non identificabile. I maschi sono rappresentati da 46 *Phlebotomus perniciosus*, 2 *Phlebotomus perfiliewi* e 458 *Sergentomyia minuta*. Le femmine, in corso di identificazione, verranno sottoposte alla ricerca di *Leishmania* spp. tramite PCR.

## Conclusioni

I dati finora ottenuti evidenziano come i casi di LV ricadano nelle zone a maggior prevalenza di LCan e come queste zone appartengano alla fascia climaticamente più calda della provincia. Ulteriori ricerche verranno svolte per valutare altre variabili climatico-ambientali associate alla presenza di flebotomi.

# Sistema di sorveglianza della Leishmaniosi canina in Emilia-Romagna

**G. Poglayen**<sup>1</sup>, **R. Baldelli**<sup>1</sup>, **M. Calzolari**<sup>2</sup>, **A. Lombardini**<sup>3</sup>, **S. Natalini**<sup>3</sup>, **M. Renzi**<sup>2</sup>, **A. Santi**<sup>2</sup>, **D. Venturini**<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Università di Bologna, Bologna, Italy, <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia, Italy, <sup>3</sup> Servizio Veterinario e Igiene degli Alimenti-Regione Emilia-Romagna, Bologna, Italy, <sup>4</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica - Azienda Unità Sanitaria Locale di Ravenna, Ravenna, Italy

## Scopo

Dagli anni '90 si è registrato un aumento dell'incidenza della leishmaniosi canina (Lcan) in Italia, con nuovi focolai in aree tradizionalmente endemiche e in regioni settentrionali precedentemente indenni. In Emilia-Romagna si è assistito all'emergenza di nuovi focolai e alla riemersione di un vecchio focolaio in provincia di Bologna (Maroli et al., 2008, Trop Med Int Health, 13: 256-264). Dal 2007 la Regione Emilia-Romagna ha attivato un piano di controllo della leishmaniosi, inserito in un più generale progetto di sorveglianza delle malattie da vettori (Venturi et al., 2009, Trop Med Int Health, 14: 49). L'obiettivo è quello di creare mappe di rischio, gestire il rischio zoonotico anche attraverso il coinvolgimento dei proprietari e dei veterinari liberi professionisti (LL.PP.), sviluppare protocolli di intervento da attuare a seguito della segnalazione di casi umani.

## Materiali e metodi

Nel periodo 2007-2012 i 73 canili pubblici regionali sono stati progressivamente inseriti in un programma di sorveglianza, che prevede il monitoraggio entomologico e sierologico sugli animali stabilmente presenti e in ingresso; in base alla presenza/assenza di cani infetti e dei vettori le strutture sono classificate in 4 classi di rischio, cui corrispondono diverse misure di prevenzione e controllo. In presenza di casi umani autoctoni, viene attivata una sorveglianza straordinaria, sia entomologica sia attiva sui cani di proprietà presenti in un raggio di 300 metri. Dal 2010 è inoltre prevista una sorveglianza passiva su cani di proprietà, in collaborazione con i veterinari clinici, che, su base volontaria, segnalano al Servizio Veterinario i casi accertati o si avvalgono, per la conferma di sospetto, del servizio diagnostico gratuito offerto dal piano.

## Risultati

La sorveglianza nei canili ha messo in evidenza la presenza di *Phlebotomus perfiliewi* e/o di *P. perniciosus* in 46 delle 73 strutture (63%). Il monitoraggio sierologico, eseguito complessivamente su 20.931 cani, ha permesso di osservare 528 casi di Lcan, distribuiti in 57 canili. Nell'ultimo triennio, inoltre, si è osservato un significativo incremento dei valori di prevalenza, accompagnato da episodi di sieroconversione in 22 canili. Nel periodo 2010-2011 è stata effettuata sorveglianza attiva su 133 cani di proprietà, riferita a 20 casi umani. Titoli dubbi nei cani e presenza del vettore sono stati osservati relativamente a casi umani in 3 province. La sorveglianza passiva sui cani di proprietà ha permesso di registrare oltre 250 casi di Lcan, comprendendo in tale numero sia quelli segnalati direttamente dai LL.PP., sia le conferme dei sospetti clinici. La georeferenziazione dei dati ha prodotto mappe di rischio, nelle quali sono stati evidenziati interessanti clusters d'infezione.

## Conclusioni

Il sistema di sorveglianza nei canili risulta compiutamente attuato. Rimane da valutarne l'efficacia in relazione alle misure applicate. Necessita di aggiustamenti la sorveglianza passiva nei cani di proprietà, con un maggiore coinvolgimento dei veterinari privati; ottimo input alla loro collaborazione è il lavoro "porta a porta" di recupero dati direttamente negli ambulatori, che rappresenta anche un momento di coordinamento tra la veterinaria pubblica e privata. Alcune criticità persistono nello sviluppo delle attività veterinarie in occasione di casi umani, che richiedono una maggiore sensibilizzazione e una più stretta collaborazione medico-veterinaria.

# Leisguard® enhances the leishmanicidal activity of canine macrophages

D. Sabaté Elias<sup>1</sup>, J. Homedes<sup>2</sup>, P. Gómez-Ochoa<sup>3</sup>

<sup>1</sup> R&D Dept. ESTEVE Veterinaria, Barcelona, Spain, <sup>2</sup> R&D Dept. ESTEVE Veterinaria, Barcelona, Spain, <sup>3</sup> Dpto. Patología Animal, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

## Introduction

Leisguard® is a domperidone based product recently approved by the Regulatory Authorities of several European countries for the treatment and prevention of canine Leishmaniosis. Its clinical efficacy has been demonstrated in several clinical trials (Gómez-Ochoa et al., 2009, *The Vet.Journal* 179: 259–263; Llinás et al., 2011, SEVC-AVEPA Congress, Barcelona;). It has been published that its administration to dogs stimulates their cell-mediated immunity leading to a statistically significant activation of phagocytic cells responsible for parasite killing

(Gómez-Ochoa et al., 2012, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 146: 97-99, Sabaté et al., 2013, SCIVAC Congress, Pisa: 117-119). The aim of the present study was to confirm that the stimulatory effect of Leisguard® on the canine phagocytic cells results in an increase of their leishmanicidal activity.

## Material and methods

The study was performed with 10 crossbreed healthy dogs of different sex, age and weight, seronegative to *Leishmania*. All dogs were administered 1ml/10kg/day of Leisguard® (equivalent to 0.5mg domperidone/kg/day) during 30 consecutive days. Blood samples from each animal were obtained at days 0 (before treatment initiation) 15 and 30. For each sample, mononuclear cells were isolated and incubated during 10 days to obtain a macrophage monolayer. Promastigotes of *Leishmania infantum* were then added to the culture medium (ratio of 10:1) and allowed to rest in contact with macrophages during 2 hours. Two days later, the percentage of infected macrophages and the number of intact parasites inside macrophages were assessed in each preparation by means of fluorescence staining of macrophage DNA. Finally, the percentage of activated macrophages in each preparation was assessed by using the Nitroblue Tetrazolium (NBT) Test (Gomez-Ochoa et al., 2010, *Vet.Parasitology* 172: 135–138).

## Results

Mean percentage of infected macrophages in preparations of day 0 was 89.0% thus confirming the validity of the experimental model. Values of preparations from days 15 and 30 were 27.2% and 24.4% respectively, being differences vs. day 0 statistically significant. These results correspond to a reduction of 70-73% in the percentage of infected macrophages. In addition, mean number of intact parasites inside macrophages among preparations from days 15 and 30 were also significantly lower than those from day 0 (9.3 and 11.3 vs. 44.4;  $p < 0.05$ ), corresponding to a reduction of 75-80% in this parameter. On the other hand, while mean percentage of activated macrophages at day 0 was 2.0%, these percentage significantly raised up to 61.1% and 62.2% in preparations from days 15 and 30 ( $p < 0.05$ ), coinciding with the lower infection rates. A statistically significant correlation ( $r = -0.93$ ;  $p < 0.01$ ) was found between the % of infected macrophages and the % of activated macrophages. Finally, microscopic evaluation of infected macrophages in preparations from days 15 and 30 revealed the presence of fragmented DNA corresponding to destroyed amastigotes inside the cytoplasm, therefore confirming that parasites had been eliminated once phagocytosed by these cells.

## Conclusions

The results of this study confirm that Leisguard® stimulates the dog's cell-mediated immunity leading to a statistically significant activation of macrophages which is correlated with a statistically significant increase of their leishmanicidal activity.