

**TREATMENT OF CANINE LEISHMANIASIS: A 24-MONTHS PARASITOLOGICAL AND CLINICAL FOLLOW-UP IN DOGS TREATED WITH MILTEFOSINE AND ALLOPURINOL**

**G. Ariti**, DVM, PhD<sup>1,2</sup>, M. Bizzeti, DVM, PhD, Associate professor<sup>2</sup>,

F. Mancianti, DVM, PhD, ECVP, Full Professor<sup>1</sup>, L. Mugnaini, DVM, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Pisa, Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Clinica Veterinaria – Università di Pisa, Pisa, Italia

Tipologia: **Ricerca Originale**  
Area di interesse: **Leishmaniosi**

**Aim of Work.** *The treatment of canine leishmaniasis is an integral part of the disease's control and the first choice drug is represented by pentavalent antimonials. For these drugs the onset of resistance has been recorded, furthermore they have to be administered twice daily parenterally, making the treatment cumbersome. Miltefosine has been licensed from 2007 in Europe as oral solution at 2% (Milteforan®) and is employed at a dosage of 2 mg/Kg once daily for 28 days. It is compulsory the association with allopurinol (10 mg/kg) for at least 6 months. The data from literature about the efficacy of this treatment are ambiguous. A 12-months study carried out by Manna et al., (2009) in an endemic area showed that the association miltefosine and allopurinol does not eliminate the parasites. Conversely, further similar studies (Mateo et al. 2009; Mirò et al., 2009; Woerly et al., 2009) reported an improvement of the clinical signs and a good leishmanicidal efficacy of the drug. The present paper reports the results of a similar investigation in dogs living in a leishmaniasis medium-endemic area, with a long term follow-up.*

**Material and Methods.** *Fourteen dogs with clinical signs were treated with a combination of miltefosine and allopurinol at the above reported dosages. At the start of the therapy and at 1, 3, 6, 9, 12 and 24 months all the dogs were investigated for haematochemical values, for specific antibodies (by IFAT) and for parasitic DNA by PCR on blood and conjunctival swabs.*

**Results.** *Four dogs out of 14 died for renal failure, only one of them (dog 13) had a renal impairment at the beginning of the treatment. After 6 month of therapy, the other dogs showed a progressive clinical improvement, including a decrease in anti-Leishmania antibody titres. Four dogs (29%) became sero-negative. Blood and conjunctiva PCR of these animals became negative. At 24 months a relapse was evident in 4/10 dogs. Complete elimination of Leishmania parasites was not observed in any subject. Two dogs had a second course of treatment after 6 months, which also failed to eradicate the parasite.*

**Conclusion.** *Our results are in agreement with data reported by Manna et al., (2009), who did not observe aetiological/clinical cure. Miltefosine has a long half-life and so a propensity for selection of resistant forms (Croft SL et al., 2006). Resistance to miltefosine may emerge easily during treatment, due to single point mutations. Decrease in drug accumulation is the common denominator in all miltefosine resistant Leishmania lines studied to date (Maltezou, 2010). Resistant promastigote clones have been generated in the laboratory. Resistance was stable after withdrawal of drug pressure and was conferred to the amastigote stage indicating that resistant parasites are able to establish infections in vivo and that the resistance could persist in vivo (Seifert et al., 2007). For these reasons this treatment should be critically evaluated in veterinary medicine also, considering that an extensive use of a poor effective drug can select resistant parasites.*

## References

1. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 19(1):111-26.
2. Maltezou HC. (2010). Drug resistance in visceral leishmaniasis. J Biomed Biotechnol. Rev. 2010:617521.
3. Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, Gravino AE. (2009). Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. Vet J. 182(3):441-5.
4. Mateo M, Maynard L, Vischer C, Bianciardi P, Mirò G. (2009). Comparative study on the short term efficacy and adverse effect of miltefosine and meglumine antimonite in dogs with natural leishmaniasis. Parasitol Res 105:155.162.
5. Mirò G, Oliva G, Israel C, Canavate C, Mortarino M, Vischer C, Bianciardi P.(2009). Multi-centric and controller clinical field study to evaluate the efficacy and safety of the combination of miltefosine and allopurinol in the treatment of canine leishmaniasis. Vet. Dermatol 20:397-404.
6. Seifert K, Pérez-Victoria FJ, Stettler M, Sánchez-Cañete MP, Castanys S, Gamarro F, Croft SL. (2007). Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of Leishmania donovani and persists in vivo. Int J Antimicrob Agents 30:229-235.
7. Woerly V., Maynard L, Sanquer A, Eun HM.(2009). Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniasis. Parasitol Res 105(2): 463-9.

## Corresponding Address:

Dott. Gaetano Ariti - Università di Pisa, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Patologia Animale Profilassi e Igiene degli Alimenti, Viale delle Piagge 2, 56100 Pisa (PI), Italia - Cell 328/0653867 - E-mail ariti@vet.unipi.it

## ANALISI SPAZIO-TEMPORALE DEI CASI DI LEISHMANIOSI CANINA IN PROVINCIA DI RIMINI NELL'ULTIMO DECENNIO

**E. Brianti**, Med Vet, PhD<sup>1</sup>, M. Parigi, Med Vet<sup>2</sup>, G. Poglayen, Med Vet, Dipl EVPC<sup>2</sup>,  
J. Rosati, Med Vet<sup>2</sup>, D. Salvatore, Biotec<sup>2</sup>, E. Napoli, Med Vet<sup>1</sup>, G. Tasini, Med Vet<sup>3</sup>, R. Baldelli, Biol<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Messina, Messina, Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Bologna, Italia

<sup>3</sup> AUSL di Rimini, Dipartimento di Sanità Pubblica, Area di Sanità Pubblica Veterinaria, Rimini, Italia

Tipologia: **Ricerca Originale**  
Area di interesse: **Leishmaniosi**

**Scopo del lavoro.** La leishmaniosi canina (LCan) è una delle più rilevanti e diffuse patologie parassitarie nei Paesi del Mediterraneo con importanti riflessi zoonotici. Negli ultimi due decenni in Italia è stato registrato un progressivo incremento dell'incidenza della malattia, associato alla diffusione della stessa verso alcune regioni settentrionali precedentemente ritenute non endemiche (Maroli et al., 2008). L'importanza sanitaria di questi fenomeni ha indotto a sperimentare nuovi sistemi di sorveglianza, avvalendosi anche dell'ausilio delle moderne tecnologie di Geographical Information Systems (GIS), con lo scopo di implementare sia l'attività di sorveglianza sia quelle di *risk-assessment* e *decision making* (Brianti et al., 2007). Nel 2007, la Regione Emilia-Romagna, nell'ambito di un progetto di sorveglianza delle malattie trasmesse da vettori, ha avviato un programma sperimentale di sorveglianza della LCan. In questo studio sono descritti e analizzati alcuni dei risultati ottenuti nel corso di tale attività allo scopo di definire i pattern spazio-temporali dell'infezione nella popolazione canina di proprietà nella provincia di Rimini e presentare, nel contempo, l'innovativo approccio metodologico utilizzato.

**Materiali e metodi.** L'attività di sorveglianza è stata condotta, nel periodo 2000-2010, in cani di proprietà residenti in provincia di Rimini, nel cui territorio insiste un focolaio ormai storico di LCan (Baldelli et al., 2001). I casi di LCan inclusi nello studio derivano da specifiche indagini epidemiologiche, dall'attività diagnostica del laboratorio di sierologia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (UNIBO), dalla segnalazione volontaria da parte dei medici veterinari liberi professionisti e dalle segnalazioni pervenute all'AUSL di Rimini. Il criterio utilizzato per la validazione dei casi faceva riferimento alla metodica diagnostica: sono stati considerati i casi di LCan identificati principalmente con metodiche sierologiche (IFI e ELISA) e/o molecolari (PCR). Per ciascun caso sono state raccolte le principali variabili relative a segnalamento, anamnesi e stato clinico. Per alcuni soggetti è stato possibile inferire anche sull'origine dell'infezione, suddividendo i casi in autoctoni ed importati. La spazializzazione è stata ottenuta in ambiente GIS mediante *geocoding* dell'indirizzo di residenza. Infine, per correggere le differenze nella frequenza dei casi, dovute esclusivamente alla diversa consistenza delle popolazioni a rischio, per ciascun poligono comunale è stato calcolato il valore del Rapporto di Incidenza (IR) per 100 cani/anno (Thrusfield, 1995).

**Risultati.** In totale, tra gennaio 2000 e giugno 2010 sono stati individuati 287 casi di LCan su una popolazione canina di proprietà stimata in 39325 soggetti per la provincia di Rimini (fonte Anagrafe Canina Regionale). La maggior parte delle segnalazioni è pervenuta dalle strutture veterinarie private (92,3%). Suddividendo le notifiche per anno è stato osservato un trend in aumento solo per le notifiche effettuate dai liberi professionisti che ha raggiunto il valore massimo nel 2008 con la notifica di 44 casi. L'origine di infezione è stata accertata solo per 97 casi, di questi la maggior parte era autoctona, tuttavia, per 35 è stata ipotizzata un'origine d'infezione "importata". L'analisi spaziale della distribuzione dei casi di LCan ha evidenziato una densità media di 2,1 casi/km<sup>2</sup> con aggregazione massima di 9,7 casi/km<sup>2</sup> nel comune di S. Giovanni in Marignano. I valori di IR più elevati (0,20-0,76) sono stati osservati nei comuni meridionali della provincia sia sul versante costiero sia nella parte collinare al confine con la Regione Marche.

**Conclusioni.** I risultati ottenuti nel corso dell'attività di sorveglianza confermano la presenza del focolaio di LCan in provincia di Rimini. I pattern spazio-temporali osservati indicano che questo focolaio oltre ad essere stabile mostra una graduale espansione. È interessante notare che i valori di densità dei casi per km<sup>2</sup> e di IR osservati in alcune aree della provincia di Rimini sono simili a quelli registrati in regioni meridionali iper-endemiche (Otranto et al., 2007). Preoccupante è inoltre la costante introduzione di casi importati che si sommano a quelli autoctoni. L'approccio metodologico utilizzato in questo progetto si è dimostrato sufficientemente valido, inoltre, l'ausilio delle tecnologie GIS ha consentito una rapida rappresentazione geografica dei casi, l'analisi spatio-temporale degli stessi e la produzione di output cartografici digitali di facile condivisione e aggiornamento. Tutti questi elementi, oltre a rientrare nel concetto stesso di sorveglianza, consentono la valutazione, in tempo reale, del rischio sanitario e la pianificazione di adeguati interventi di controllo, facendo intravedere un sistema di notifica che possa finalmente far emergere il problema leishmaniosi nella sua reale dimensione epidemiologica.

### Bibliografia

1. Maroli et al. 2008. Trop Med Inter Health, 13: 256-264.
2. Brianti et al. 2007. Vet Research Comm, 31: 213-215.
3. Baldelli et al. 2001. Parassitologia, 43: 151-153.
4. Thrusfield M. 1995. Veterinary Epidemiology. Blackwell Science Ltd, London, UK.
5. Otranto et al. 2007. Vet Parasitol, 144: 270-278.

Indirizzo per corrispondenza: Dr. Emanuele Brianti - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Messina, Polo Universitario Dell'Annunziata, 98168 Messina (ME), Italia - Tel. 090/3503716 - E-mail: ebrianti@unime.it

## PIANO DI CONTROLLO DELLA LEISHMANIOSI CANINA IN EMILIA ROMAGNA

Lombardini A.<sup>1</sup>, Natalini S.<sup>1</sup>, Santi A.<sup>2</sup>, Dell'Anna S.<sup>2</sup>, Renzi M.<sup>2</sup>,  
Calzolari M.<sup>2</sup>, Galletti G.<sup>2</sup>, Maioli G.<sup>2</sup>, Martini E.<sup>1</sup>, Tamba M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Regione Emilia-Romagna - Servizio Veterinario e Igiene degli Alimenti

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna

Tipologia: **Ricerca Originale**  
Area di interesse: **Leishmaniosi**

**Scopo del lavoro.** In Emilia Romagna (ER) è attivo dal 2007 un Piano di controllo della Leishmaniosi canina (Lcan) finalizzato alla conoscenza della diffusione della malattia sul territorio regionale (distribuzione di flebotomi, cani infetti e casi umani). Nel corso del triennio 2007-2009 tutti i canili della regione sono stati censiti, georiferiti e suddivisi in 4 classi di rischio sulla base della presenza/assenza del vettore e di cani infetti<sup>1</sup>. Le attività di controllo e prevenzione di Lcan all'interno dei canili sono definite sulla base della classe di rischio assegnata. Il piano prevede anche misure di sorveglianza veterinaria attiva da svolgere in seguito alla segnalazione di casi umani e il coinvolgimento dei veterinari libero-professionisti (LP) nella segnalazione di nuovi casi di Lcan sui cani di proprietà. In questo lavoro si riportano i risultati delle attività nel periodo 2007-2010.

**Materiali e metodi.** Nel corso del 2010 in tutti i canili sono state mantenute le attività previste dalle classi di rischio assegnate: sorveglianza passiva, monitoraggio nuove introduzioni, controllo di cani sentinella, terapia sui cani infetti, misure di profilassi e sorveglianza entomologica. Numerosi veterinari LP hanno collaborato al piano, prelevando campioni di sangue da cani di proprietà con sintomi compatibili con Lcan e segnalando alla AUSL competente i nuovi casi rilevati nel corso dell'attività ambulatoriale. In seguito a segnalazione di casi umani è stata effettuata la sorveglianza entomologica e, dove possibile, il prelievo sui cani di proprietà presenti nel raggio di 300 metri. I sieri prelevati dai cani sono stati esaminati mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) con *cut-off* pari a 1:160<sup>2</sup>. Per i cani positivi sono state raccolte le informazioni anagrafiche e anamnestiche, utilizzando schede standardizzate. I cani con titolo pari a 1:40 o 1:80, considerati dubbi, sono stati ricontrollati dopo 6 mesi. Il monitoraggio entomologico nei canili si è svolto quindicinalmente da giugno a ottobre di ogni anno, mediante l'impiego di trappole adesive non attrattive (*sticky traps*), posizionate in stazioni fisse di campionamento<sup>3</sup>. Nelle vicinanze dei casi umani la ricerca del vettore è stata svolta con trappole attrattive (CDC).

**Risultati ottenuti.** Nel periodo 2007-2010 la sorveglianza sierologica nei canili ha interessato complessivamente 79 strutture e 14.822 cani, di cui 329 sono risultati IFI positivi (prevalenza 2,22%, IC 95%: 1,99% – 2,47%). Dalle 263 schede anamnestiche raccolte è emerso che il 56% dei cani infetti non presenta sintomatologia clinica. La sorveglianza entomologica ha individuato la presenza di *Ph. perniciosus* e *Ph. perfiliewi* in 36 canili su 71 esaminati (50,7%). La sorveglianza attiva mediante cani sentinella ha evidenziato 14 sieroconversioni in 13 canili, 11 delle quali riconducibili alla stagione epidemica 2009. Nell'ambito della sorveglianza passiva su cani di proprietà, sono stati esaminati 144 cani sospetti, di cui 8 (5,5%) sono risultati positivi. I veterinari LP hanno complessivamente segnalato 42 nuovi casi, nel 62% delle segnalazioni i soggetti infetti presentavano sintomi riferibili a Lcan. In conseguenza della segnalazione di 12 casi umani, sono stati esaminati 73 cani di proprietà, nessuno dei quali è risultato positivo. In 4 casi delle province di BO, RE e FO è stata rilevata la presenza di *Ph. perniciosus* e *Ph. perfiliewi*.

**Conclusioni.** Alla fine del 2010 è stato possibile calcolare la prevalenza di Lcan nei canili della regione ER. Le sieroconversioni hanno interessato le province di MO, BO, FE e RN, confermando la presenza dell'infezione in alcune delle zone già storicamente sede di focolai autoctoni di Lcan<sup>4</sup>. Il piano ha consentito l'aggiornamento delle mappe di rischio, che permettono la valutazione di misure adeguate per ridurre la diffusione della Lcan nella popolazione canina e possono fornire un supporto alla gestione e prevenzione dei casi umani. Il coinvolgimento dei veterinari LP ha permesso di individuare nuovi casi e di approfondire la conoscenza della reale diffusione della malattia sul territorio regionale. Le attività del piano sono state confermate per il triennio 2011-2014.

### Bibliografia

1. Dell'Anna S, Renzi M, Calzolari M, Galletti G, Maioli G, Rugna G, Martini E, Tamba M, Sorveglianza della leishmaniosi nei canili dell'Emilia Romagna. Risultati preliminari 2007-2009. Atti II Congr. Int Leishmaniosi canina. Pisa 2010.
2. Gradoni L, Gramiccia M, Khoury C, Maroli M, Linee guida per il controllo del serbatoio canino della Leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. Rapp.ISTISAN 04/12, 2004.
3. Maroli M, Bigliocchi F, Khoury, I flebotomi in Italia: osservazioni sulla distribuzione e metodi di cattura. Parassitol. 1994;36:251-264.
4. Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, Genchi C, Gradoni L, Gramiccia M, Maroli M, Mortarino M, Pietrobelli M, Rossi L, Ruggiero M, Monitoraggio della leishmaniosi canina in nord Italia: aggiornamenti da un network scientifico Parassitol. 2004;46:193-197.

### Indirizzo per corrispondenza:

Dott. Silvano Natalini - Regione Emilia-Romagna Servizio Veterinario e Igiene degli Alimenti  
Viale Aldo Moro 21, 40121 Bologna (BO), Italia  
Tel. 051/5277384 - Cell. 3474184282 - E-mail: SNatalini@regione.emilia-romagna.it

## TRASMISSIONE VERTICALE DI LEISHMANIA INFANTUM IN UNA CUCCIOLATA

F. Ibba, Medico Veterinario <sup>1</sup>, P. Manca, Biologo <sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Libero Professionista, Capoterra, Italia

Tipologia: **Caso Clinico**  
Area di interesse: **Leishmaniosi**

**Introduzione.** *Leishmania infantum*, agente causale della leishmaniosi canina, è un protozoo trasmesso da insetti vettori appartenenti al genere *Phlebotomus*. La trasmissione verticale di questo patogeno è stata spesso ipotizzata ma solo nel 2009 è stato confermato l'avvenuto passaggio materno fetale in una cucciolata. Si trattava però di soggetti nati morti in seguito ad una gravidanza portata a termine. Il caso in oggetto rappresenta invece, per i dati in nostro possesso, del primo caso dimostrato di trasmissione verticale non perinatale.

Descrizione del caso Bora è un cane di razza setter, femmina intera, di 3 anni, nella quale viene diagnosticata una infezione da *Leishmania infantum*, secondo i criteri stabiliti dal GSLC, grazie alla presenza di sintomi clinici e alterazioni clinicopatologiche compatibili con leishmaniosi ed evidenziazione citologica di amastigoti in sede linfonodale.

Il cane viene sottoposto a terapia leishmanicida con sali d'antimonio e allopurinolo per trenta giorni, e una volta ottenuta una remissione sintomatologica e laboratoristica completa viene mantenuto in terapia continuativa con il solo allopurinolo. A distanza di 6 mesi dalla diagnosi la cagna si accoppia e si instaura una gravidanza che viene interrotta mediante ovarioisterectomia. L'intervento chirurgico, suggerito dal veterinario curante ed accettato dal proprietario, viene eseguita alla data supposta del 35° giorno di gestazione. Al momento della chirurgia, condotta secondo tecniche standard, l'utero viene asportato integro. Solo in un secondo momento, a intervento concluso, viene dissezionato con strumentario sterile al fine di estrarre intatti i cuccioli non vitali. A questo punto, sempre in maniera da evitare qualsiasi tipo di contaminazione, viene campionata la milza intera da ciascuno dei quattro cuccioli. Alla madre viene contestualmente eseguito un aspirato midollare. I prelievi delle quattro milze campionate e del midollo appartenente alla madre vengono sottoposti a PCR Real Time per la ricerca di *Leishmania infantum* dal laboratorio di biologia molecolare mediante amplificazione e quantificazione con metodica identica per tutti i campioni usando uno strumento Lightcycler system della Roche. Il campione di midollo appartenente alla madre risultò contenere dieci alla terza copie di DNA PCR di *Leishmania* per microlitro di estratto, ed anche i campioni di milza di tre cuccioli su quattro risultarono positivi, uno con un titolo di 10 alla terza e altri due con un titolo di 10 alla seconda DNA PCR di *Leishmania* sempre per microlitro di estratto.

**Conclusioni.** In questo particolare caso è possibile affermare che la via di trasmissione verticale della leishmaniosi canina è un evento possibile, anche se rimane da chiarire il peso epidemiologico del fenomeno e la meccanica attraverso cui ciò sia possibile. Nel caso oggetto di questa comunicazione possiamo concludere che l'infezione del prodotto del concepimento sia avvenuta ben prima del parto (prima del trentacinquesimo giorno di gestazione) e che quindi sono da escludere la contaminazione legata a traumi e scambi di materiale subiti durante il travaglio. Non è altresì possibile stabilire se l'infezione dei cuccioli, una volta portata a termine la gravidanza, debba necessariamente esitare in malattia conclamata oppure possa andare incontro a guarigione spontanea. A questo riguardo va fatto notare, inoltre, come la quantità di leishmanie conteggiate raggiunga solo in un cucciolo il titolo di 10 alla terza copie di DNA PCR di leishmania per microlitro di estratto come nella madre. Bisogna comunque tenere presente che nel caso della madre si tratta di midollo emopoietico e non di milza, per cui i due valori possono non essere confrontabili. Ulteriori studi andranno eseguiti su più ampia scala sia per determinare l'incidenza della trasmissione verticale di leishmania e la sua importanza epidemiologica, sia per identificare i motivi della differente carica parassitaria ritrovata nei cuccioli.

### Bibliografia

- First report of vertical transmission of Leishmania (*Leishmania*) *infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. Da Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN, Michalick MS. *Vet Parasitol.* 2009 Dec 3;166(1- 2):159-62. Epub 2009 Aug 15.
- Disseminated *Leishmania infantum* infection in two sibling foxhounds due to possible vertical transmission. Gibson-Corley KN, Hostetter JM, Hostetter SJ, Mullin K, Ramer-Tait AE, Boggiatto PM, Petersen CA. *Can Vet J.* 2008 Oct;49(10):1005-8.

### Indirizzo per corrispondenza:

Dott. Fabrizio Ibba - Ambulatorio Veterinario Dr. Ibba Fabrizio Strada 40 N. 5  
Località Poggio Dei Pini, 09012 Capoterra (CA), Italia  
Tel. 070/725552 - Cell. 3339116263 - E-mail: palmasoriano@tiscali.it

## APPLICAZIONE DEL PIANO REGIONALE DI CONTROLLO DELLA LEISHMANIOSI CANINA NEL TERRITORIO DELL'ASL DI BOLOGNA-ANNO 2010

F. Matteucci, DVM<sup>1</sup>, B. Spaggiari, DVM<sup>1</sup>, A. Marliani, DVM<sup>1</sup>, O. Melloni, DVM<sup>1</sup>, S. Natalini, DVM<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Azienda Unità Sanitaria Locale, Area di Sanità Pubblica Veterinaria, Bologna, Italia

<sup>2</sup> Regione Emilia Romagna, Servizio Veterinario e Igiene degli Alimenti, Bologna, Italia

Tipologia: **Ricerca Originale**  
Area di interesse: **Leishmaniosi**

**Scopo del lavoro.** Scopo del lavoro è presentare i risultati dell'applicazione del Piano Regionale di controllo della leishmaniosi canina per il 2010 sul territorio dell'ASL di Bologna (ASL BO).

**Materiali e metodi.** Nel 2010 il Piano Regionale, che già prevedeva azioni di sorveglianza e controllo nelle strutture di ricovero per cani, è stato ampliato con la sorveglianza passiva sui cani di proprietà e attiva in seguito alla segnalazione di casi umani<sup>1</sup>. Nel territorio dell'ASL BO i Servizi Veterinari hanno attuato la sorveglianza mediante indagini sierologiche, entomologiche, collaborazione col Servizio di Igiene Pubblica e stimolando il coinvolgimento dei veterinari LP. La sorveglianza sierologica è stata effettuata mediante raccolta di dati anagrafici ed anamnestici (modulistica allegata al Piano), prelievo di sangue e test di immunofluorescenza indiretta. Sono stati considerati positivi titoli = 1:160<sup>2</sup> e dubbi = 1:40/1:80 (ricontrollati dopo 6 mesi). Nei canili, già inseriti in una delle 4 classi di rischio in base alle attività del triennio precedente, è stato testato un numero pre-stabilito di cani sentinella nel periodo febbraio-maggio, oltre a tutti i soggetti in ingresso. Il monitoraggio entomologico è stato eseguito mediante l'utilizzo di trappole adesive (sticky traps) nei canili in classe 4 e trappole attrattive CDC nelle zone di sorveglianza in seguito a caso umano<sup>3</sup>.

**Risultati.** CANILI: Dei 13 canili esistenti nel territorio della ASL BO, 8 sono in classe 1, (presenza di cani sieropositivi e del vettore). In tali strutture vengono sistematicamente testati i cani in ingresso e le sentinelle. I rimanenti 4 canili sono in classe 4 (assenza di sieropositivi e del vettore). In tutti e 13 i canili vengono comunque applicate misure antivettoriali ai soggetti ospitati, come misura preventiva trattandosi di zone endemiche. Su un totale di circa 1100 cani presenti, nel corso del 2010 sono stati diagnosticati 22 casi di positività e 40 casi dubbi. Tutti i cani positivi sono sottoposti a trattamento farmacologico secondo un protocollo terapeutico deciso dal sanitario del canile. I cani positivi o dubbi possono andare in adozione previa sottoscrizione di consenso informato che garantisca l'impegno del proprietario per i necessari adempimenti. CANI DI PROPRIETÀ: Il coinvolgimento dei veterinari LP ha portato nel 2010 ad un incremento delle segnalazioni di casi di leishmaniosi in cani di proprietà principalmente nei territori di Bologna Sud (collina e montagna) e Città. In 11 comuni delle zone collinari sono stati testati complessivamente 156 cani di proprietà (di cui 33 a seguito di segnalazione di caso umano) su una popolazione canina stimata di circa 17000 individui, evidenziando un totale di 6 positivi e 9 dubbi. Nel comune di Bologna sono state effettuate 4 segnalazioni di cani positivi. Ai proprietari dei cani positivi sono state impartite prescrizioni relative al trattamento farmacologico sotto controllo del veterinario LP di fiducia, all'utilizzo di misure antivettoriali ed al ricovero notturno del cane durante il periodo di attività del vettore. CASI UMANI: Nel 2010 sono stati segnalati 5 casi di leishmaniosi viscerale, 3 nel distretto Bologna Sud e 2 nel distretto Bologna Città. Per tre di questi è probabile un'origine non autoctona. In un caso l'indagine entomologica ha rivelato la presenza del vettore (*Ph. perfliewi*) nelle zone limitrofe al focolaio, mentre nessuno dei 43 cani finora testati nelle zone di sorveglianza è risultato positivo o dubbio. Per due casi le indagini sono ancora in corso.

**Conclusioni.** Per quanto riguarda i CANILI la situazione appare favorevole: nel 2010 anche i focolai autoctoni evidenziati nel triennio precedente appaiono non più attivi. Le misure antivettoriali individuali, il monitoraggio dei nuovi ingressi e la terapia dei soggetti positivi garantiscono il mantenimento del controllo dell'infezione. Le segnalazioni di casi nei CANI DI PROPRIETÀ sono avvenute principalmente in territori storicamente sensibili al problema. La possibilità di richiedere analisi di conferma gratuite per il proprietario del cane, il ruolo fondamentale nella gestione del cane positivo in seguito alle raccomandazioni prescritte dai Servizi Veterinari, in assenza di provvedimenti coattivi nei confronti del proprietario, ed il contributo diretto all'aggiornamento costante delle mappe di rischio sono importanti elementi per il coinvolgimento dei veterinari LP. Implementare tale partecipazione anche negli altri territori mediante attività di formazione in collaborazione con l'Ordine è tra gli obiettivi del 2011, unitamente a campagne d'informazione rivolte ai cittadini e finalizzate ad una corretta conoscenza delle problematiche connesse alla leishmaniosi. Per quanto riguarda le azioni intraprese a seguito di CASI UMANI, occorre preventivamente valutare la situazione epidemiologica ovvero il livello di rischio del territorio, nonché sensibilizzare la cittadinanza per ottenere collaborazione nelle indagini sierologiche.

### Bibliografia

1. Dell'Anna S, Renzi M, Calzolari M, Galletti G, Maioli G, Rugna G, Martini E, Tamba M. Sorveglianza della leishmaniosi nei canili dell'Emilia Romagna. Risultati preliminari 2007-2009. Atti II Congr. Int. Leishmaniosi canina. Pisa 2010.
2. Gradoni L, Gramiccia M, Khoury C, Maroli M. Linee guida per il controllo del serbatoio canino della Leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. Rapp.ISTISAN 04/12, 2004.
3. Maroli M, Bigliocchi F, Khoury C. I flebotomi in Italia: osservazioni sulla distribuzione e metodi di cattura. Parassitol. 1994;36:251-264.

Indirizzo per corrispondenza: Dott.ssa Francesca Matteucci - ASL Bologna, Via G.Di Vittorio 16, 40038 Vergato (BO), Italia  
Tel. 0516740132 - E-mail: fr.matteucci@ausl.bologna.it



**VARIATION OF PROTEINURIA IN DOGS AFFECTED BY LEISHMANIASIS TREATED WITH  
MEGLUMINE ANTIMONIATE AND ALLOPURINOL: 53 CASES**

**M. Pierantozzi**, Med Vet, PhD, <sup>1</sup>, X. Roura, Med Vet, PhD, Dipl ECVIM-CA, <sup>3</sup>,  
S. Paltrinieri, Med Vet, PhD, Dipl ECVCP, <sup>2</sup>, M. Poggi, Med Vet, <sup>4</sup>, A. Zatelli, Med Vet, <sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Clinica Veterinaria Pirani, Reggio Emilia, Italy*

<sup>2</sup> *Università degli Studi di Milano, Milano, Italy*

<sup>3</sup> *Università di Barcellona, Barcellona, Spain*

<sup>4</sup> *Clinica Veterinaria - Centro Veterinario Imperiese, Imperia, Italy*

Tipologia: **Ricerca Originale**  
Area di interesse: **Leishmaniosi**

**Introduction.** Canine leishmaniasis (CanL)-associated proteinuric nephropathy is characterized by glomerular damage primarily attributed to glomerular deposition of circulating immune complexes.<sup>1</sup> Results of previously published studies suggest that, in dogs, persistent proteinuria is associated with greater frequency of renal morbidity and mortality.<sup>2</sup> A recent study demonstrated a potential reno-protective activity of allopurinol decreasing proteinuria and preventing progression of renal disease in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis.<sup>3</sup>

**Objective.** The aim of the study was to investigate whether the degree of proteinuria, evaluated by urine protein-to-creatinine ratio (UP:C), in leishmaniotic dogs classified in clinical stage C according to the staging of Canine Leishmaniasis Working Group,<sup>4</sup> changes during anti-protozoan treatment with meglumine antimoniate (MA) and allopurinol (A). Furthermore, we evaluated the variations and correlations between serum concentration of albumin, globulin, total protein and A/G before and after treatment.

**Material & Methods.** Medical records (2006-2010) of the Clinica Veterinaria Pirani (Italy), Veterinary Teaching Hospital of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain) and Centro Veterinario Imperiese (Italy) were reviewed to identify proteinuric leishmaniotic dogs, irrespective of their azotemic status, treated with the combination MA + A for a period ranging between 4 to 8 weeks. Dogs recruited for this study fulfilled the following inclusion criteria: a) diagnosis of leishmaniasis established by clinicopathological abnormalities; b) positive serology for *L. infantum* and detection of *Leishmania* amastigotes in lymph node or bone marrow aspiration smears or detection of parasite DNA using PCR; c) negative serology for *E. canis* and *Dirofilaria immitis*; d) complete urinalysis, with inactive sediment, and determination of the UP:C just before and after the anti-*Leishmania* treatment; e) treatment with MA (75-100 mg/kg SC q24h) in combination with A (20 mg/kg PO q24h) for 4 to 8 weeks. Dogs should not have been treated with ACE-inhibitors and/or angiotensin receptor blocker in the 2 months prior to and throughout the anti-*Leishmania* treatment period. Dogs with clinical signs and clinicopathological findings consistent with neoplastic, endocrine and genetic (inherited nephropathies known or suspected) diseases correlated with proteinuria, were excluded.

**Results.** Before treatment, a significant negative correlation was found between UP:C and both serum albumin concentration ( $P=0.029$ ,  $r=-0.41$ ) and A/G ratio ( $P=0.006$ ,  $r=-0.39$ ) and a significant positive correlation was found between UP:C and total globulin ( $P=0.027$ ,  $r=0.31$ ). No correlations between UP:C and total protein were found ( $P=0.062$ ,  $r=0.27$ ). UP:C, total protein and globulin significantly decreased after treatment, compared with pre-treatment values. Conversely, albumin and the A/G ratio recorded after treatment were significantly higher than those recorded just before treatment. For all parameters, pre- and post-treatment values were always significantly correlated to each other ( $P<0.001$  for all). After treatment: 7 proteinuric or borderline proteinuric dogs (13.4%) became non-proteinuric, 12 proteinuric dogs (22.6%) became borderline proteinuric. 12 dogs (22.6%) modified their IRIS stage based on values of serum creatinine and UP:C.

**Conclusions.** The laboratory findings detected before treatment (hyperproteinemia, hypoalbuminemia, hyperglobulinemia, decreased A/G ratio, proteinuria) are consistent with those previously reported by other authors on CanL.<sup>5</sup> The hyperproteinemia caused by hyperglobulinemia observed in this study, corroborates the findings of other Authors who reported that in some leishmaniotic dogs there is an increase in total protein levels due to a greater production of antibodies. Similar to that reported in a recent study,<sup>2</sup> the anti-*Leishmania* treatment reduces the magnitude of proteinuria; nevertheless, in contrast to the aforementioned study, which shows the reduction of proteinuria after 6 months of administration of A, our results show a significant reduction of UP:C after 4-8 weeks of treatment. This result may be related to the mechanism of action of 2 drugs used: the combined use of MA and A could lead to a more rapid reduction of parasitic load, and consequently of the circulating immune complexes that affect the kidneys. In conclusion, it is plausible to suggest that it is useful, to stage the proteinuric leishmaniotic dog according with the IRIS staging system,<sup>6</sup> at the end of the anti-*Leishmania* treatment in order to correctly identify the dogs that need anti-proteinuric therapy and optimize the conditions for monitoring the therapeutic efficacy.

## References

1. Lopez R, et al. J Vet Med B 1996;43:469-474.
2. Jacob F, et al. J Am Vet Med Assoc 2005;226:393-400.
3. Plevraki K, et al. J Vet Intern Med 2006;20:228-233.
4. Paltrinieri S, et al. J Am Vet Med Assoc 2010;236:1184-1191.
5. Koutinas AF, et al. J Am Anim Hosp Assoc 1999;35:376-383.
6. www.iriskidney.com/pdf/IRIS2009\_Staging\_CKD.pdf.

Corresponding Address: Dott. Marco Pierantozzi - Clinica Veterinaria Pirani, Via Vladimir Majakovskij 2/n, 42100 Reggio Emilia (RE), Italy - E-mail mp@clinicaveterinariapirani.it

## VALUTAZIONE PRELIMINARE DEL RUOLO DELLA PAROXONASI E DI ALTRI PARAMETRI INFIAMMATORI COME INDICATORI DI REMISSIONE CLINICA IN CANI TRATTATI PER LEISHMANIOSI

G. Rossi, DVM, PhD<sup>1</sup>, F. Ibba, DVM<sup>2</sup>, E. Buffoli, DVM<sup>1</sup>, A. Giordano, DVM, PhD, dipl. ECVCP<sup>1</sup>, S. Paltrinieri, DVM, PhD, dipl. ECVCP<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sezione di Patologia Animale e Parassitologia, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

<sup>2</sup> Libero professionista, Cagliari, Italia

Tipologia: **Ricerca Originale**  
Area di interesse: **Leishmaniosi**

**Scopo del lavoro.** A fronte di protocolli diagnostici<sup>1</sup> e terapeutici<sup>2</sup> consolidati, non è ancora stato standardizzato il protocollo ideale per il monitoraggio a breve termine dei pazienti trattati per leishmaniosi canina (LCan)(2). Mentre è noto il ruolo prognostico di alcuni analiti, soprattutto legati alla funzionalità renale, infatti non sono stati definiti né i marker che meglio potrebbero predire in tempi brevi la risposta alle terapie né la tempistica da seguire per ottenere informazioni precoci in questo senso. La LCan genera una marcata risposta infiammatoria che si rispecchia nell'iperproteinemia, nell'ipergammaglobulinemia<sup>3</sup> e nell'aumento delle proteine di fase acuta<sup>4</sup>. Il monitoraggio dell'entità dell'infiammazione nel tempo potrebbe quindi fungere da fattore prognostico, come già dimostrato per alcune delle proteine di fase acuta<sup>5</sup>. Tra queste ultime può risultare utile la valutazione dell'attività della paroxonasi (PON1) proteina di fase acuta negativa, recentemente studiata nel cane, che riflette non solo lo stato infiammatorio ma anche lo stress ossidativo che in corso di LCan risulta aumentato<sup>6</sup>. Questo studio ha lo scopo di valutare in via preliminare, su un campione ridotto di casi, se le variazioni nel tempo di alcuni marker infiammatori, e in particolare dell'attività di PON1 possono essere utili come indicatori di remissione clinica nella LCan trattata farmacologicamente.

**Materiali e metodi.** La casistica comprendeva nove cani di razza ed età variabili, naturalmente infetti da leishmania con differente sintomatologia e differente gravità. Criteri di inclusione nello studio: diagnosi di LCan confermata tramite test citologici, sierologici e PCR, assenza di trattamenti antinfiammatori/leishmanicidi prima dell'inclusione nello studio, assenza di altre patologie interferenti. Al momento dell'inclusione nello studio (T0) sono stati effettuati un esame emocromocitometrico, esami ematochimici di routine (proteine tot, albumine, colesterolo, trigliceridi, ALP, ALT, GGT, BUN, creatinina, bilirubina tot., amilasi, glucosio, calcio) ed è stata valutata la proteinuria. Sono stati inoltre indagati i seguenti markers infiammatori: proteina C reattiva (CRP), PON1, elettroforesi delle sieroproteine. I cani sono stati trattati con antimoniato di N-metilglucamina (100 mg/kg sc per un mese) e allopurinolo (10 mg/kg bid per os). I markers infiammatori sopra citati sono stati valutati al 3° giorno dall'inizio della terapia (T1), a una settimana (T2) e settimanalmente per tempi variabili tra 4 (T5) e 6 settimane (T7).

**Risultati.** Ad eccezione di un paziente, che mostrava una lesione localizzata, tutti i pazienti presentavano sintomi sistemici (linfadenomegalia, dimagrimento, lesioni cutanee) anche se in nessun caso era presente iperazotemia. Due dei 9 cani non hanno risposto alla terapia e sono deceduti prima della fine del trattamento mentre in 7 casi è stata osservata una remissione della sintomatologia intorno alla seconda-terza settimana.

Al momento della diagnosi i soggetti che non hanno risposto alla terapia mostravano una minore attività paraoxonasi, una maggiore concentrazione di CRP e per quanto riguarda il profilo elettroforetico ipoproteinemia e un minore rapporto A/G dovuto sia ad ipoalbuminemia che ad aumento delle alfa2 e, in minor misura, delle gamma-globuline. Nei cani che non hanno risposto alla terapia tali alterazioni restano stabili nel tempo, mentre nei cani che hanno risposto alla terapia si assiste a una normalizzazione dell'attività di PON1 dopo 3-7 giorni (ad eccezione di un soggetto con sospetta insufficienza epatica), della concentrazione di CRP dopo circa 3-4 settimane, e dei parametri elettroforetici dopo circa un mese (solo il rapporto A/G, pur innalzandosi, non rientrava mai nella norma).

**Conclusioni.** I risultati sembrano indicare che la prognosi migliore si abbia nei soggetti che presentano un quadro infiammatorio meno marcato al momento della diagnosi e che la PON1 fornisca informazioni più precoci rispetto ad altri biomarker circa la probabilità di remissione clinica in corso di terapia per LCan. Data la natura del tutto preliminare di questo studio sarà importante verificare in futuro la sua applicabilità a un campionamento più esteso.

### Bibliografia

1. Paltrinieri et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. JAVMA 236(11):1184-91;2010.
2. Oliva et al. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. JAVMA 236(11):1192-98;2010.
3. Riera et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. Vet Parasitol 84:33-47;1999.
4. Martinez-Subiela et al. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. Vet Rec 150(8):241-4;2002.
5. Martinez Subiela S, Ceron JJ. Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment. Vet Med -Czech, 2005; 50: 39-46.
6. Paltrinieri et al. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniasis. Vet J 186:393-5;2010.

### Indirizzo per corrispondenza:

Dott. Gabriele Rossi - Università Degli Studi Di Milano Dipartimento Di Patologia Animale, Igiene E sanità Pubblica Veterinaria-Sez. Patologia Generale, Via Celoria, 10, 20133 Milano (MI), Italia - Tel 02/50318103 - E-mail gabriele.rossi@unimi.it