

DESCRIZIONE DI UN NUOVO FOCOLAIO DI LEISHMANIOSI CANINA NELLA REGIONE VENETO

MARTA VASCELLARI¹, ALDA NATALE¹, ERNESTO SCHIEVENIN², ANTONIO MIATTO³, ANTONIO BRINO³, ANTONIO FRANGIPANE DI REGALBONO⁴, MARIO PIETROBELLI⁴

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratori di Istopatologia e di Parassitologia

²Medico Veterinario libero professionista, "Clinica Veterinaria Città di Conegliano" Conegliano (TV)

³Servizio Veterinario AULSS n° 7 Pieve di Soligo (TV)

⁴Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie, Università degli Studi di Padova

Riassunto

Il presente articolo ha lo scopo di descrivere l'approccio epidemiologico attuato in seguito alla segnalazione di casi autoctoni di leishmaniosi canina in aree considerate precedentemente indenni. Sulla base di un caso clinico autoctono accertato nel febbraio 2003 nel comune di Vittorio Veneto (TV), da luglio ad ottobre dello stesso anno è stata condotta un'indagine entomologica che ha documentato la presenza del vettore della malattia. Sulla base dei risultati ottenuti, lo studio è proseguito nel 2004 con un'indagine sierologica sulla popolazione canina, tesa a valutare la consistenza dell'eventuale focolaio, e con un'indagine entomologica che è stata estesa ad alcuni comuni limitrofi.

Summary

The epidemiological approach, following the diagnosis of an autochthonous clinical case of canine leishmaniosis occurred in a disease-free area, is described. On February 2003 an autochthonous clinical case of canine leishmaniosis was confirmed in the municipality of Vittorio Veneto (Veneto Region, northeastern Italy). In order to evaluate the presence and the density of the sandfly vectors in the affected municipality, an entomological survey started in July, by means of sticky and light traps (CDC type). On the basis of the preliminary results obtained, in spring 2004 a serological survey on the canine population of Vittorio Veneto was carried out. Furthermore, in summer of the same year the entomological survey was extended to the neighbouring municipalities.

INTRODUZIONE

La leishmaniosi è un'importante zoonosi protozoaria presente con diverse specie (*Leishmania* spp.), diversi cicli epidemiologici ed altrettante forme di malattia in Europa, Asia, Africa, centro e sud-America, soprattutto in aree tropicali e subtropicali.

In Italia l'infezione è sostenuta da un'unica specie, *Leishmania infantum*, responsabile della leishmaniosi viscerale (LV) e cutanea (LC) dell'uomo e della leishmaniosi canina (Lcan). La trasmissione avviene attraverso un insetto vettore ematofago appartenente al genere *Phlebotomus* e l'unico serbatoio riconosciuto della malattia è il cane. La distribuzione della Lcan fino al 1989 escludeva tutte le regioni del Nord, fatta eccezione per la Liguria¹, ma a partire degli anni '90 sono stati via via segnalati nuovi focolai stabili in alcune Regioni italiane. La maggior parte di essi si presenta

in aree di endemia classica, come alcune zone dell'Emilia Romagna^{2,3}, della Toscana⁴, dell'Umbria⁵ delle Marche⁶ e dell'Abruzzo⁷. In tutte le altre regioni in cui la Lcan è endemica l'incidenza dell'infezione non accenna a diminuire, ponendo seri problemi di sanità pubblica: nel 2001 sono stati segnalati circa 200 casi di leishmaniosi viscerale nell'uomo⁸. La novità più interessante da un punto di vista epidemiologico è però la comparsa di focolai stabili di Lcan in aree del nord Italia ritenute precedentemente indenni: in particolare, giungono segnalazioni dalla provincia di Verona⁹, dal Piemonte^{10,11} e dal Triveneto^{12,13}. Le indagini entomologiche effettuate in questi nuovi focolai a partire dagli anni novanta hanno dimostrato la presenza di vettori sospetti o provati di Lcan, quali: *P. perniciosus*^{11,14}, *P. mascittii* (limitatamente al Piemonte)¹⁵ e *P. neglectus*, ritrovato per la prima volta nel '94 nel focolaio della Valpolicella¹⁴, nel '98 ad Ivrea¹⁵ e nel 2002 in provincia di Trento¹⁶ e di Treviso¹⁷. Quest'ultima specie potrebbe aver contribuito alla diffusione della Lcan in alcune aree del nord Italia.

La necessità di monitorare i nuovi focolai di Lcan nel territorio nazionale, sia per ragioni di sanità animale sia di

¹Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 10/4/2005 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 13/6/2005.

sanità pubblica, ha dato origine, durante il biennio 2003-2004, al network scientifico denominato "LeishMap" (<http://pets.intervet.it/PetScience/Leishmaniosi.asp>), che si pone come obiettivi principali quelli di sorveglianza sulla diffusione della Lcan e dei suoi vettori in tutto il nord Italia, e di monitoraggio sulla persistenza/espansione dei focolai accertati negli anni precedenti.

Nel presente lavoro vengono descritti un caso clinico autoctono di Lcan, diagnosticato nel comune di Vittorio Veneto (TV), e le conseguenti indagini epidemiologiche attuate nel territorio comunale al fine di accertare la reale presenza del focolaio e la sua consistenza.

CASO CLINICO

Nel mese di febbraio 2003 un cane meticcio femmina di 9 anni è stato sottoposto a visita clinica a causa di una dermatite cronica ulcerativa del padiglione auricolare destro, frequentemente sanguinante e refrattaria alle terapie precedentemente attuate. All'esame obiettivo generale il soggetto presentava condizioni generali scadenti, moderata depressione del sensorio, ipertermia (39,5°C), linfadenopatia generalizzata, pelo opaco, ipercheratosi e dermatite furfuracea, prevalentemente localizzata sul muso. Gli esami ematobiochimici evidenziavano moderata anemia normocitica normocromica, trombocitopenia e marcata iperglobulinemia.

Mediante reazione di immunofluorescenza indiretta (IFI), utilizzando come antigene promastigoti di *L. infantum* (zimodema MON1), è stata evidenziata una positività anticorpale con titolo 1:320. La diagnosi di leishmaniosi è stata confermata dall'Istituto Superiore di Sanità (Roma) con metodo diretto tramite nested-PCR, con utilizzo di DNA genomico, da puntato linfonodale e splenico¹⁸.

Il soggetto, nato e vissuto nel comune di Vittorio Veneto, non era mai uscito dal territorio comunale.

Il proprietario ha deciso di non attuare la terapia farmacologica, optando per la soppressione dell'animale.

RICERCA ENTOMOLOGICA

Al fine di accertare la presenza del vettore della Lcan sono stati scelti 4 siti di cattura localizzati nel territorio collinare strettamente circostante la residenza del soggetto positivo. Da luglio ad ottobre 2003 sono state effettuate complessivamente 17 raccolte entomologiche con cadenza bisettimanale.

Da luglio a settembre 2004 è stata inoltre attuata una campagna di monitoraggio entomologico nel territorio collinare dei comuni limitrofi nel comprensorio dell'AULSS N° 7, allo scopo di valutare la presenza/assenza del vettore. Sono stati individuati 16 siti di cattura, per un totale di 50 raccolte entomologiche.

La scelta dei siti comprendeva aree periurbane o rurali, con presenza di diverse specie animali-esca, oppure di muretti a secco, adatti ad offrire rifugio diurno ai flebotomi.

Per la cattura dei flebotomi sono state utilizzate trappole oleate (sticky traps) e trappole luminose (CDC light-traps), collocate all'interno dei ricoveri animali o sulle pareti delle gabbie, delle recinzioni o dei canili.

L'identificazione degli esemplari raccolti è stata eseguita presso il Laboratorio di Parassitologia ed Ecopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro, PD). I flebotomi sono stati fissati in alcool, chiarificati in clorallattofenolo, montati su vetrino con fenolo-balsamo ed identificati su base morfologica con l'ausilio della chiave di Romi¹⁹.

INDAGINE SIEROLOGICA

Al fine di accertare la presenza di un focolaio di leishmaniosi e di indagarne la consistenza, nella primavera 2004 è stata condotta un'indagine sierologica, con criterio di casualità, su un campione significativo della popolazione canina residente nel comune di Vittorio Veneto. Il numero minimo di cani da controllare (n=294) è stato calcolato (WinEpiscope 2.0) con lo scopo di individuare almeno un positivo considerando: popolazione infinita, prevalenza attesa 1%, livello di confidenza 95%. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, in collaborazione con il Laboratorio di Parassitologia e Malattie Parassitarie della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova e con l'AULSS N° 7 di Pieve di Soligo, ha organizzato una giornata di prelievi gratuiti, alla quale sono stati invitati tutti i proprietari dei cani. Per la raccolta dei dati è stata utilizzata una scheda anamnestica, nella quale sono state raccolte le informazioni relative alla provenienza del soggetto, alla sua eventuale permanenza in aree endemiche per Lcan, alle abitudini di vita (habitat, ricovero notturno, attitudine) e la presenza o meno di sintomi clinici riferibili alla malattia. L'indagine sierologica è stata eseguita con metodica IFI, (cut-off 1:40). La soglia 1:40 è stata scelta considerando la notevole specificità del test e lo svolgimento dello studio in un'area precedentemente considerata indenne dall'infezione. Lo screening sierologico ha avuto lo scopo di evidenziare con la maggiore sensibilità possibile gli individui "contattati" dal parassita (OIE, 2004). I soggetti risultati positivi all'indagine sierologica sono stati poi sottoposti a ricerca diretta dell'agente eziologico (esame citologico, nested-PCR con utilizzo di DNA genomico, esame colturale).

In base ai primi risultati sierologici ed entomologici è stata individuata un'area territoriale "a rischio" del raggio di 1 km, ed attuata una seconda giornata di campionamento sierologico mirata a testare la popolazione canina presente all'interno della suddetta zona.

RISULTATI

La ricerca entomologica effettuata nel comune di Vittorio Veneto (2003) ha permesso di catturare 366 flebotomi, 91 con sticky traps e 275 con CDC. Delle quattro stazioni selezionate, tre sono risultate positive, sebbene la maggioranza dei flebotomi (359 su 366) sia stata catturata in una sola stazione, confermando la distribuzione discontinua, a "macchia di leopardo", del vettore. L'identificazione ha consentito di stabilire che 365 esemplari appartenevano alla specie *P. perniciosus* e 1 alla specie *P. neglectus* (Tab. 1).

È stata inoltre calcolata la densità dei flebotomi nei diversi siti di cattura valutandola secondo gli indici suggeriti dall'OMS (Tab. 2), con valori medi generali di 7,26 flebo-

tomi/m², variabili da 0,2 (sito 1) a 17,50 flebotomi/m² (sito 3), con picchi stagionali di *P. perniciosus* pari a 26,79/m² nel sito 3.

Nella prima indagine sierologica il numero complessivo di soggetti testati è stato 330. È stato riscontrato un solo nuovo caso di positività (prevalenza: 0,30%), con titolo anticorpale IFI 1:320, in un cane boxer di 10 anni residente nella stessa area cittadina del primo caso autoctono. Il soggetto non aveva mai compiuto viaggi in zone considerate endemiche e non presentava sintomi specifici di leishmaniosi, sebbene fossero presenti segni minori (scarsa qualità del mantello, magrezza), attribuiti al normale deperimento dovuto all'età e ad altre patologie intercorrenti. La diagnosi è stata confermata con metodica nested-PCR eseguita su sangue, mentre l'esame citologico da ago aspirato linfonodale ha dato esito negativo.

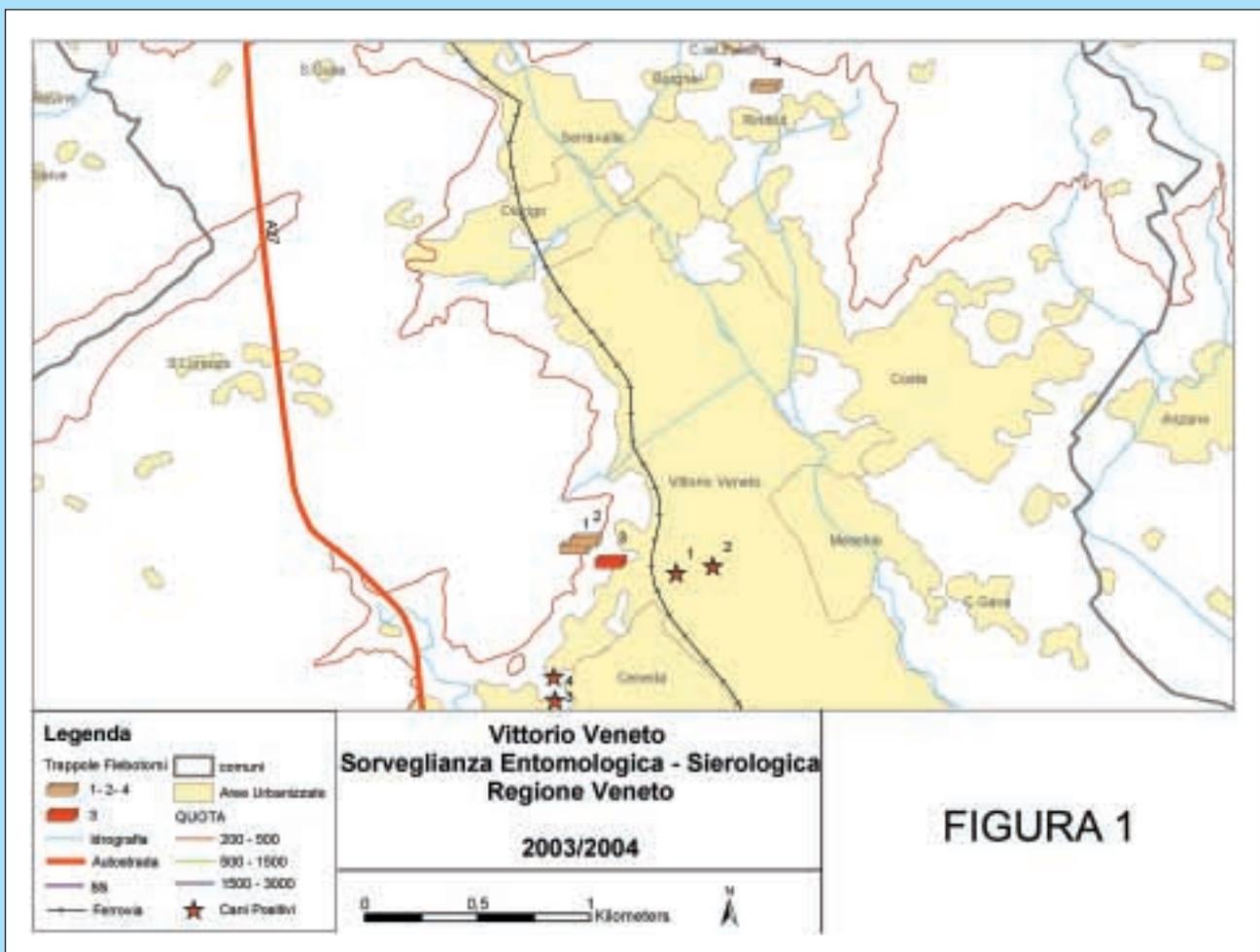
Nel corso della seconda giornata di prelievo sono stati testati 53 soggetti presenti nel raggio di 1 km dalla residenza dei primi due casi accertati. Di questi, 2 soggetti sono risultati positivi al test IFI (prevalenza: 3,77%), con titolo 1:320 e 1:160, rispettivamente. Entrambi i cani, appartenenti al medesimo proprietario, risultavano non aver mai soggiornato in aree endemiche. La diagnosi è stata confermata per entrambi i soggetti mediante ago aspirato linfonodale ed esame colturale. I risultati delle indagini entomologiche e sierologiche attuate nel comune di Vittorio Veneto sono presentati nella Figura 1.

Tabella 1
Risultati delle catture entomologiche eseguite da luglio ad ottobre 2003 nel comune di Vittorio Veneto

N° stazione	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. neglectus</i>	Totale
1	0	1	1
2	0	0	0
3	359	0	359
4	6	0	6
Totale	365	1	366

Tabella 2
Valutazione secondo indici OMS (1979) della densità di flebotomi/m² di superficie (sticky traps)

Densità	Flebotomi/m ²
bassa	< 8
media	tra 8 e 32
alta	> 32



La ricerca entomologica attuata nei comuni limitrofi (2004) ha evidenziato la presenza del vettore in 5 delle 16 stazioni di cattura (Fig. 2), per un totale di 17 flebotomi raccolti, tutti identificati come *P. perniciosus*.

DISCUSSIONE

L'indagine ha confermato la presenza di un microfocolaio autoctono di Lcan nel comune di Vittorio Veneto. I 4 casi accertati sono localizzati in un'area circoscritta e corrispondente ad una significativa densità del vettore.

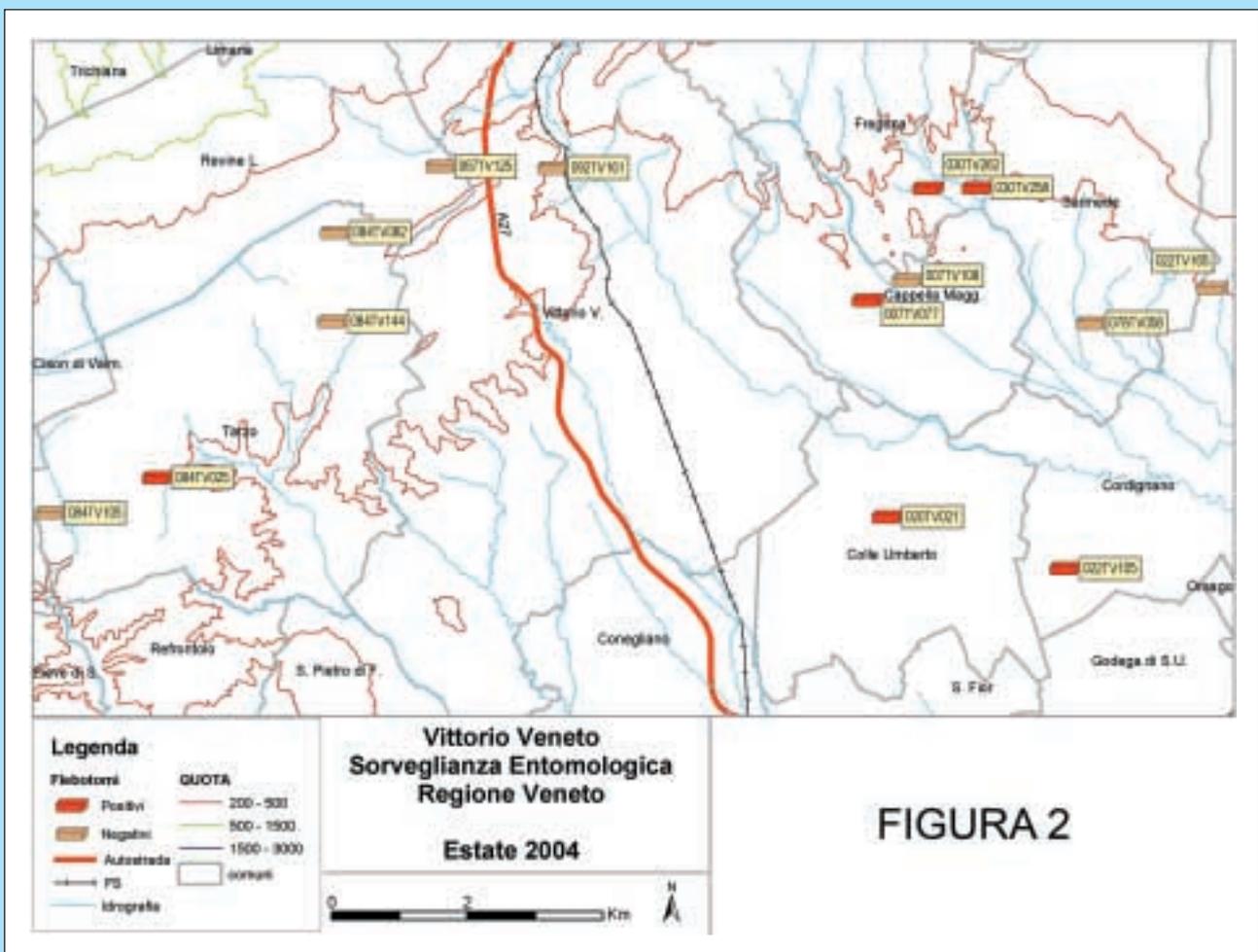
La presenza del vettore, che ha mostrato densità medio-basse secondo gli indici OMS, è considerata comunque sufficiente al mantenimento di un focolaio, così come dimostrato in aree iperendemiche²⁰.

La bassa prevalenza d'infezione riscontrata sino ad oggi è indicativa di un focolaio instabile, probabilmente recente, che potrebbe stabilizzarsi, espandersi o scomparire, anche in dipendenza degli interventi sanitari e dell'attenzione rivolta al problema.

Le indagini entomologiche attuate nell'estate 2004 hanno permesso di verificare la presenza del vettore nei comuni limitrofi. La caratteristica distribuzione dei flebotomi, tipicamente discontinua, rende necessario uno studio capillare del territorio con mappatura precisa di diverse aree campione. Tali aree costituiscono una base di partenza per

l'utilizzo dei Sistemi Geografici Integrati (GIS), che permettono un'importante evoluzione nello studio epidemiologico delle malattie degli animali, sia come rappresentazione grafica degli andamenti a livello geografico (uso descrittivo) sia come analisi spaziale (uso analitico). I GIS, inoltre, possono essere di ausilio nella determinazione dei modelli di simulazione e possono aiutare a predire l'incidenza della malattia in diverse aree. Disponendo di archivi di dati aggiornati, è possibile creare delle mappe che descrivano l'evoluzione della situazione epidemiologica e permettano di monitorare nel tempo le dinamiche spaziali della malattia.

Si sottolinea, inoltre, l'importanza che riveste la collaborazione tra i veterinari che operano nell'ambito clinico e gli enti istituzionali, al fine di attuare una sorveglianza attiva nei confronti della malattia e di favorire lo scambio dei dati anche in aree considerate non endemiche. È consigliabile l'introduzione di una sorveglianza sierologica di routine con comunicazione ai Servizi Veterinari delle eventuali positività riscontrate (art. 5 del Regolamento di Polizia Veterinaria). Le stesse devono essere sempre confermate mediante affiancamento di diverse metodiche diagnostiche, e comunque con diagnosi diretta (puntato linfonodale o midollare, PCR, esame colturale). L'IFI, tuttora considerata il Gold Standard²¹, rappresenta un buon test di screening per il basso costo, l'altissima specificità, la semplicità di esecuzione e di raccolta del cam-



pione, pur risentendo dell'esperienza dell'operatore nella quantificazione del risultato.

Si ricorda, inoltre, l'importanza della protezione specifica anti-flebotomo per i cani residenti nelle aree a rischio, mediante l'applicazione di piretroidi ad uso topico con effetto anti-feeding e knock-down, presenti in commercio con varie formulazioni (spray, protector band, spot on). Tali prodotti, per le loro caratteristiche di resistenza all'acqua e di lipofilia, consentono un'efficacia nettamente più durevole rispetto ai tradizionali repellenti. Anche per i cani infetti la protezione è decisamente raccomandata, sia per evitare loro nuove inoculazioni dell'agente eziologico, sia perché, soprattutto nelle aree ipoendemiche, rappresenta il mezzo ad oggi più efficace per ridurre la diffusione della malattia. Per ulteriori indicazioni sulla profilassi e terapia si rimanda alle linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità: www.iss.it/publ/rapp/2004/0412.pdf.

Parole chiave

Cane, leishmaniosi, flebotomo, focolaio.

Key words

Dog, leishmaniosis, sandfly, outbreak.

Bibliografia

- Pozio E, Gradoni L, Gramiccia M: La leishmaniose canine en Italie de 1910 a 1983. *Ann Parasitol Hum Comp* 60: 543-553, 1985.
- Baldelli R, Battelli G, Maroli M, et al: A new stable focus of canine leishmaniosis in northern Italy. *Parassitol* 43: 151-153, 2001.
- Mollicone E, Battelli G, Gramiccia M, et al: A stable focus of canine leishmaniosis in the Bologna province (Italy). *Parassitol*, 45: 85-88, 2003.
- Pedonese F, Mancianti F, Bernardini S, et al: Further records on canine leishmaniosis in the province of Pisa (Tuscany). *Animal Biol.* 9: 101-103, 2000.
- Corradetti C, Spinelli G, Khoury C, et al: Prima indagine entomologica sulla presenza di vettori di leishmaniosi in focolai campione della provincia di Perugia. XIX Congresso Nazionale Italiano Entomologia, Catania, 2002, p 235.
- Bongiorno G, Habluetzel A, Traldi G et al: Notes on the sand fly fauna and their feeding habits from an inland focus of canine leishmaniosis in central Italy (Marche region). *Parassitol* 44 (Suppl. 1):23, 2002.
- Dalla Villa P, Ruggieri F: Situazione epidemiologica della leishmaniosi canina in provincia di Pescara. Congresso Igiene Urbana Veterinaria, Roma, 1999, p 137.
- Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A: Visceral leishmaniosis treatment, Italy. *Emerg Infect Dis* 9: 1617-1620, 2003.
- Poglayen G, Marangon S, Manca MG et al: A new outbreak of canine leishmaniosis in the north-east of Italy. *Acta Parasitol Turc* 21 (1): 143, 1997.
- Rossi L, Ferroglio E, Guiso P, et al: Segnalazione di un focolaio di leishmaniosi canina sulla collina torinese. *Med Vet Prev* 20: 20, 1999.
- Ferroglio E, Maroli M, Castaldo S, et al: Survey on phlebotomine sandflies in North-West Italy. *Parassitol* 44 (Suppl. 1): 68, 2002.
- Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, et al: Monitoraggio della leishmaniosi canina in nord Italia: aggiornamenti da un network scientifico. *Parassitol* 46: 193-197, 2004.
- Capelli G, Natale A, Frangipane di Regalbano A, et al: Spreading of canine leishmaniosis in north-eastern Italy. IX European Multicolloquium of Parasitology, Valencia, 2004, pp18-23.
- Maroli M, Sansoni L, Bigliocchi F, et al: Reperimento di *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 (P. major s.l.) in un focolaio di leishmaniosi nel nord Italia (Provincia di Verona). *Parassitol* 37: 241-244, 1995.
- Maroli M, Khoury C, Bianchi R, et al: Recent findings of *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 in Italy and its western limit of distribution. *Parassitol* 44: 103-109, 2002.
- Ferrarese U, Maroli M: Ricerche sui flebotomi (Diptera, Psychodidae) in provincia di Trento nel 2001. *Annali del Museo Civico - Rovereto* 18: 171-179, 2002.
- Natale A, Vascellari M, Schievenin E, et al: A new focus of canine leishmaniosis in Veneto region? International Congress on Canine Leishmaniosis, SCIVAC, Napoli, 2004, pp 95-96.
- Gramiccia M, Ludovisi A, Nardoni S, et al: PCR and Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood from dogs living in endemic areas of Italy. *J Euk Microbiol*, 50: 36A, 2003.
- Romi R, Khoury C, Bigliocchi F, Maroli M: Schede guida su acari e insetti di interesse sanitario. *Rapporti ISTISAN* 94/8: 33-42, 1994.
- Ascione R, Gradoni L, Maroli M.: Studio eco-epidemiologico su *Phlebotomus perniciosus* in focolai di leishmaniosi viscerale della Campania. *Parassitol* 38: 495-500, 1996.
- Gradoni L, Gramiccia M, Khoury C, et al: Linee guida per il controllo del serbatoio canino della leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. *Rapporti ISTISAN*, 04/12, 2004.

ENDOCRINOLOGIA NEL VET-MED-LAB



Un servizio veloce, attendibile e conveniente, con una vasta gamma di esami per i vostri pazienti

Lasciatevi tentare!
 Profilo tiroideo per cani:
 T4, FT4, TSH canino 35,75 €
 Profilo tiroideo per gatti:
 T4, FT4 23,40 €

- Surrene
- Tiroide
- Ormoni sessuali
- Altri ormoni

LABORATORIO PER MEDICI VETERINARI

Vet-Med-Lab



Per richiedere l'opuscolo dedicato ai test ormonali contattate i colleghi presso:

Vet-Med-Lab - divisione di IDEXX Laboratories Italia s.p.a. - responsabile Italia: Dr. Christiane Scheidt
 Piazza S. Pio X, 2/1 - 31030 Coster (TV) - Tel. 0422-670891 - Fax 0422-670880 - e-mail: c.scheidt@vetmedlab.it - www.vetmedlab.com