

Valutazione dell'evoluzione dell'infezione da *Leishmania infantum* in cani naturalmente infetti in area endemica

RIASSUNTO

Introduzione e scopo del lavoro - È noto che l'evoluzione clinica dell'infezione da *Leishmania infantum* nel cane è fortemente influenzata dal sistema immunitario dell'ospite; tuttavia pochi sono gli studi che valutano il decorso clinico-patologico dell'infezione nel tempo, sia in condizioni naturali che sperimentali. Obiettivo del presente lavoro è quello di monitorare nel tempo gli aspetti clinici, diagnostici e laboratoristici in cani naturalmente infetti da *L. infantum* in area endemica.

Materiali e metodi - Lo studio parte da 218 cani negativi ai test diagnostici per *L. infantum* nel Marzo del 2005; di questi, 23 cani si sono positivamente ad uno o più test diagnostici tra Novembre 2005 e Marzo 2006. Gli animali infetti sono stati monitorati sierologicamente (IFAT), parassitologicamente (analisi microscopica del prelievo linfonodale, PCR su biopsia cutanea) e clinicamente, mediante uno score clinico-patologico ogni 4 mesi fino a Marzo 2007.

Risultati - Dalla valutazione longitudinale integrata dei test diagnostici in ciascun follow-up col punteggio clinico-patologico, gli animali naturalmente infetti sono stati inclusi in 3 categorie evolutive d'infezione: *transitoria asintomatica* (11 cani), *persistente asintomatica* (2 cani), *patente sintomatica* (8 cani).

Discussione - I risultati di questo studio confermano l'elevata variabilità nell'evoluzione dell'infezione da *L. infantum* in aree endemiche e sottolineano la difficoltà di proporre un sistema chiaro per prevedere il decorso clinico dell'infezione mediante campionamenti effettuati in un unico tempo. Per tale motivo è consigliabile continuare a monitorare gli animali infetti al fine di facilitare qualsiasi interpretazione clinica o l'inizio di un'eventuale terapia.

Paola Paradies, Mariateresa Sasanelli,
Valeria Zaza, Donato de Caprariis,
Paolo Lia Riccardo, Gabriella Testini,
Domenico Otranto

Dipartimento di Salute Pubblica e Zootecnia,
Facoltà di Medicina Veterinaria, Bari

INTRODUZIONE

La leishmaniosi canina, sostenuta da *Leishmania infantum*, è ampiamente diffusa in molti paesi del Mediterraneo con indici di prevalenza che, in Italia, vanno dall'1,7% al 48%¹ e con un'incidenza annuale che nelle regioni meridionali raggiunge il 9,52%². Nelle aree endemiche i cani infetti mostrano un ampio spettro di segni clinici, che va da forme gravi a forme asintomatiche in oltre il 50% dei cani^{3,4}. I cani infetti, sia sintomatici che asintomatici, sono considerati importanti serbatoi di *L. infantum* per i flebotomi, vettori della malattia, giocando un ruolo fondamentale nella trasmissione del protozoo all'uomo⁵. Nelle zone endemiche, i cani esposti alla puntura dei flebotomi infetti possono sviluppare la forma clinica, restare portatori asintomatici o, talvolta, liberarsi dell'infezione in virtù di un'efficiente risposta immunitaria individuale^{6,3}. Tuttavia, pochi sono gli studi che valutano il decorso clinico-patologico dell'infezione nel tempo, sia in condizioni naturali^{7,8} che sperimentali^{9,10}. In Italia, l'evoluzione clinica in corso d'infezione da *L. infantum*, è stata valutata⁷ solo in cani di razza non autoctona (beagles) ed è riconosciuto che fattori genetici possano influenzare il tipo di risposta immunitaria e la relativa produzione citochinica¹¹ determinando un quadro evolutivo differente. Lo scopo di questo lavoro è stato di analizzare il decorso dell'infezione naturale da *L. infantum* nel corso di due anni, in cani autoctoni (di canile) in area endemica, attraverso il monitoraggio di dati clinici e laboratoristici. Agli animali infetti è stato assegnato un punteggio in base ai rilievi clinico-patologici e, lo stesso, è stato utilizzato, in associazione ai risultati dei test diagnostici, per collocare gli animali nei vari pattern d'infezione.

MATERIALI E METODI

A partire da 218 cani risultati negativi per *L. infantum* nel Marzo del 2005 nel corso di un precedente studio longitudinale¹², sono stati selezionati 23 animali che si sono positivamente per la prima volta ad uno o più test diagnostici per *L. infantum* fra Novembre 2005 e Marzo 2006¹². In particolare le metodologie diagnostiche utilizzate includevano la sierologia (IFAT), la PCR su biopsia cutanea e l'analisi microscopica da campioni linfonodali. I cani risultati positivi per *L. infantum* a uno o più test sono stati inclusi nello studio come cani recentemente infetti e su questi animali sono stati successivamente effettuati dei campionamenti ogni 4 mesi per 1 anno, fino a Marzo 2007. Durante il prelievo dei campioni gli animali sono stati sottoposti a visita clinica e i segni clinici più indicativi di leishmaniosi (alopecia, dermatiti, congiuntiviti, onicogriposi, linfadenopatia etc.) registrati di volta in volta su cartelle individuali. Oltre ai test sierologici e/o parassitologici specifici per *L. infantum* prima citati, è stato anche effettuato l'esame emocromocromi-

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 22/04/2009 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 21/10/2009".

tometrico e l'elettroforesi delle proteine sieriche. I dati riguardanti il valore dell'ematokrito (Hct%), le proteine totali (TP), il rapporto albumine/globuline (A/G) e la percentuale di gammaglobuline (% γ) sono stati quindi registrati ed integrati con i risultati dell'esame clinico e dei test diagnostici specifici in ciascun follow-up nel corso dello studio.

Procedure diagnostiche

IFAT (Test di Immunofluorescenza indiretta). Il test è stato eseguito usando come antigene promastigoti di *L. infantum* appartenenti allo zimodema MON-1'. Le cellule sono state incubate in termostato a 37°C per 30 minuti, prima con i sieri diluiti (1:80) in soluzione PBS (Phosphate Buffered Saline), e successivamente con anticorpi di coniglio anti-IgG di cane, marcati con fluoresceina in diluizione 1:40 (Rabbit anti-dog IgG; Sigma - Aldrich Chemie, Germany). Utilizzando 1:80 come diluizione cut-off, i campioni venivano considerati positivi quando a contatto con i promastigoti di *L. infantum* conferivano a questi una netta fluorescenza citoplasmatica o di membrana. I sieri positivi sono stati titolati fino alla negativizzazione.

ANALISI MICROSCOPICA. Il prelievo del materiale linfonodale è stato effettuato tramite ago-infissione, senza aspirazione¹³. Gli strisci linfonodali sono stati colorati utilizzando la colorazione di Diff Quick (Medical Team Srl, Italia,) e quindi sono stati esaminati per rivelare la presenza di forme amastigote di *Leishmania* spp.

PCR SU BIOPSIA CUTANEA. Il prelievo del campione di cute è stato eseguito mediante bisturi da oftalmologia usa e getta, nella regione corrispondente alla spalla sinistra e dopo tosatura del pelo in un'area di circa 0,5 x 0,5 x 0,6 cm. I campioni sono stati conservati a -20°C in provette Eppendorf che contenevano 1 ml di soluzione PBS (Phosphate Buffered Saline). Dopo la frammentazione in azoto liquido e la macinazione (due cicli di congelamento-scongelo), si è estratto il DNA genomico da circa 50 mg di campione cutaneo usando un kit commerciale (Genomic DNA Purification Kit, Genra Systems, Minnesota, USA). Si è quindi amplificato un frammento di minicircolo di DNA da cinetoplasto di *L. infantum* usando MC1 e MC2 come primer¹⁴. Il DNA genomico (4 μ l) è stato aggiunto alla miscela di reagenti della PCR (46 μ l) contenente 2,5 mM di MgCl₂, 10 mM di Tris-HCl, pH 8,3 e 50 mM di KCl, 250 μ M di ciascun dNTP, 50 pmol di ciascun primer e 1,25 U di Ampli Taq Gold (Applied Biosystems, Milano, Italia). Sono state utilizzate le seguenti condizioni ottimali per standardizzare l'amplificazione PCR: denaturazione iniziale a 94°C per 12 minuti, 30 cicli comprendenti denaturazione a 94°C per 30 secondi, ibridazione a 60°C per 20 secondi, estensione a 72°C per 30 secondi ed estensione finale a 72°C per 5 minuti. In tutti i campioni sono stati

inclusi un controllo positivo contenente DNA genomico di *L. infantum* e un controllo negativo privo di DNA. I prodotti di amplificazione (~447 bp) sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2% (p/v) (Ambion), colorati con etidio bromuro.

Valutazione clinico-patologica

Le alterazioni clinico-patologiche registrate in ciascun cane durante lo studio sono state espresse con un punteggio finale ottenuto sommando singole alterazioni compatibili con lo stato di malattia: presenza di singoli segni clinici (es. linfadenopatia, onicogrifosi, perdita di peso, dermatiti, ulcere cutanee, lesioni oculari), ematokrito <37%, conta piastrinica <100x10³/ μ l, proteine totali sieriche >7,5g/dl, rapporto albumine/globuline <0,6, gammaglobuline >18%. Gli animali sono stati valutati in base alle caratteristiche clinico-patologiche e i risultati integrati con i risultati dei test diagnostici al fine di collocare ogni cane in differenti categorie di decorso dell'infezione.

RISULTATI

I risultati dei test diagnostici e del punteggio clinico-patologico assegnato a ciascun cane in ogni follow-up sono riportati nella Tabella 1. Dei 23 cani inclusi nello studio, 19 sono risultati positivi per *L. infantum* alla PCR o alla sierologia a Novembre 2005 (primo follow-up), mentre i restanti 4 si sono positivizzati a Marzo del 2006 (secondo follow-up). Durante tutto il periodo di studio (Novembre 05-Marzo 07), 10 cani sono risultati positivi alla sola PCR in tempi diversi, mentre, gli altri hanno mostrato un quadro diagnostico variabile (Tab. 1). Quattro cani (n. 15, 16, 17 e 18) hanno mostrato risultati positivi ad uno o più test diagnostici dal primo all'ultimo follow-up mentre due (n. 20 e 21) a partire dal mese di marzo del 2006 fino all'ultimo follow-up (Tab. 1). Due cani (n. 18 e 19), positivi all'IFAT +/- PCR al primo e al secondo controllo, sono deceduti. In totale, su 23 cani, 6 hanno sviluppato uno o più segni clinici (perdita di peso, linfadenomegalia, ulcere, uveite e/o alterazioni di laboratorio) con patterns diagnostici differenti (Tab. 1). A causa della gravità dei segni clinici 3 animali (n. 6, 12 e 20) sono stati trattati con terapia specifica (antimoniato di meglumina 100 mg/kg/bid per quattro settimane e allopurinolo 15 mg/kg/bid per 6 mesi). I valori dell'ematokrito sono risultati elevati in tutti gli animali, tranne in uno (n. 14). Alterazioni dell'elettroforesi delle proteine sieriche sono state registrate in tutti i cani che hanno sviluppato i segni clinici e sempre prima dell'insorgenza dei sintomi (dati non rappresentati). In un unico cane (n. 13) la sintomatologia clinica, al terzo follow-up, è rientrata in maniera spontanea in assenza di terapia. Due cani colpiti da malattia e sottoposti a trattamento,

TABELLA 1

Risultati dei test diagnostici (Sier: sierologia con IFAT per rivelare gli anticorpi anti-*Leishmania infantum*, PCR: polymerase chain reaction su tessuto cutaneo, Cit: esame al microscopio dello striscio linfonodale) e punteggio clinico-patologico (Pcp) degli animali inclusi nello studio e raggruppati in accordo a pattern diagnostici simili. Il quadrato (■) indica la positività ad ogni specifico test. Gli animali che hanno sviluppato i segni clinici sono segnati da un asterisco (*) e il tempo di insorgenza e la persistenza dei segni clinici è indicata dallo sfondo grigio. La lettera T indica i cani trattati a causa della gravità dei segni clinici con terapia specifica

	I follow up Nov. 05			II follow up Mar. 06				III follow up Lugl. 06				IV follow up Nov. 06				V follow up Mar. 07			
	PCR	Sier	Pcp	PCR	Sier	Cit	Pcp	PCR	Sier	Cit	Pcp	PCR	Sier	Cit	Pcp	PCR	Sier	Cit	Pcp
1	■		0				1				2				1				1
2	■		1				1				1				1				1
3	■		0				0				1				1				0
4	■		1	■			1				2				1				2
5	■		0	■			0				0				0				0
6*	■		0	■			5 T				0				0				1
7	■		1	■			1				0				0				0
8	■		0	■			0				0				1	■			0
9	■		0	■			0				0				0	■			1
10	■		1	■			0				0				0	■			1
11	■	■	0				0				1				0				0
12*		■	3		■	■	5		■		2 T				1				0
13*	■		3	■	■	■	4		■		5		■		5				2
14*		■	3		■		3		■		6		■		7	■	■		5
15*	■		0	■	■		3	■	■	■	4	■	■	■	5	■	■	■	5
16	■	■	1		■		1		■		0		■		2	■	■	ND	2
17	■		1		■		2		■		0		■		0	■	■	ND	2
18	■	■	3	■	■		2												
19		■	1		■		0												
20*			0	■	■	■	1	■	■	■	5 T	■			0	■			0
21			1	■	■	■	1		■		4		■		4		■		0
22			0	■	■	■	3				0				1				0
23			0		■	■	0				1				1		■	■	0

sono risultati negativi a tutti i test diagnostici nei successivi follow-up (Tab. 1).

Dalla valutazione longitudinale dei tests diagnostici e dal punteggio clinico-patologico il decorso dell'infezione è stato suddiviso nelle seguenti categorie:

1) *infezione transitoria asintomatica*, positività transitoria ad almeno un test per un breve lasso di tempo e punteggio clinico-patologico costantemente <3 (11 cani: n. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 23).
 2) *infezione persistente asintomatica*, positività costante alla PCR +/- IFI durante lo studio e punteggio clinico-patologico <3 (2 cani: n. 16, 17).

3) *infezione patente sintomatica*, positività ai test parassitologici e sierologici e punteggio clinico-patologico ≥ (8 cani: n. 3, 6, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22). Il numero dei cani e i valori percentuali elencati nelle succitate categorie di infezione sono riportati nella Tabella 2.

TABELLA 2

Numero e valore percentuale (su un totale di 23 cani infetti) dei cani inseriti nelle categorie d'infezione. Le categorie sono state create in base ai risultati dei test diagnostici ed al punteggio clinico-patologico finale ottenuto sommando le singole alterazioni compatibili con la malattia (es. presenza di un unico segno clinico, HCT < 37%, PLT < 100x10³/ml, PT > 7,5g/dl, A/G < 0,6%, gammaglobuline > 18%)

Categorie di infezione	Punteggio clinico-patologico	n. cani (%)	
Infezione transitoria asintomatica	< 3	11 (47,8)	56,5% cani asintomatici
Infezione persistente asintomatica	< 3	2 (8,7)	
Infezione sintomatica	≥ 3	8 (34,7)	34,7% cani sintomatici

DISCUSSIONE

Questo studio suggerisce che nelle aree endemiche le infezioni da *L. infantum* possono presentare differenti quadri evolutivi. Infatti, è noto che il decorso clinico della leishmaniosi nelle aree endemiche dipende da una serie di fattori associati alla presenza e al numero di punture del flebotomo, alle specie di leishmanie coinvolte e soprattutto all'ospite (in termini di pattern di risposta immunitaria e predisposizione genetica)¹⁵. La complessità nell'interpretazione dei test diagnostici ed il pleomorfismo della presentazione clinica rende la leishmaniosi canina una sfida diagnostica per i veterinari nelle aree endemiche e pone molte problematiche nel prevedere il decorso clinico dell'infezione. I sette animali (30,4%) risultati transitoriamente positivi alla PCR su tessuto cutaneo all'inizio dello studio (I e II follow-up) dopo la prima stagione dei flebotomi, ma che sono poi risultati negativi a tutti i campionamenti successivi, suggeriscono che il sistema immunitario sia stato in grado di controllare l'infezione da *Leishmania* spp. a livello cutaneo in seguito alla puntura del flebotomo.

In alcuni studi sperimentali sull'infezione da *Leishmania* spp. nei topi^{16,17,18} e in cani asintomatici¹⁹, è stato suggerito che la presenza dei parassiti a livello cutaneo rilevata con la metodica PCR poteva essere dovuta o ad una recente inoculazione da parte dei flebotomi o al fatto che la cute agisce come tessuto-reservoir di amastigoti in ospiti immunocompetenti dopo la generalizzazione dell'infezione.

La positività transitoria alla PCR è stata già riportata in una popolazione di animali monitorati in area endemica per *Leishmania* spp.⁷, ma su campioni di midollo osseo. È stato suggerito che la positività transitoria alla PCR possa essere dovuta ad una temporanea diminuzione della carica parassitaria nel midollo al di sotto dei livelli investigabili o anche ad una clearance dall'infezione seguita, o no, da re-infezione nella successiva stagione dei flebotomi nei casi di ripositivizzazione⁷. Le categorie che sono state proposte in questo studio per definire il decorso dell'infezione sostenuta da *L. infantum*, sono state ricavate dall'insieme delle caratteristiche diagnostiche, cliniche e clinico-patologiche registrate in ciascun cane durante lo studio longitudinale. Degli animali asintomatici risultati positivi transitoriamente alla PCR e/o al test IFAT il 30,4% risultava persistentemente negativo ai successivi campionamenti mentre il 17,4% si ripositivizzava dopo un periodo in cui era risultato negativo. In quest'ultimo caso, l'evoluzione dell'infezione verso una condizione di patenza non poteva essere esclusa. Due cani con infezione patente sintomatica ma segni clinici lievi (n. 21 e 22) non hanno mostrato alcuna progressione clinica nel corso dello studio probabilmente grazie alla loro capacità individuale di controllare l'infezione²⁰. La mancanza di

un'evoluzione clinica dell'infezione nei cani paucisintomatici è stata già descritta in corso d'infezione sperimentale in cui i cani che mostravano solo qualche lieve segno clinico volgevano a remissione spontanea al termine dello studio⁹. Al contrario, in cani di razza beagle infettati naturalmente e colpiti in forma conclamata, non si è mai avuta una risoluzione clinica spontanea⁷ probabilmente per il fatto che le razze non autoctone sono più suscettibili all'infezione da *L. infantum*. L'aumento delle gammaglobuline, registrato in tutti gli animali che hanno sviluppato segni clinici ancor prima della comparsa dei sintomi e in precedenza già documentato¹⁰, suggerisce che esso possa rappresentare ancora un valido marker per il monitoraggio dell'infezione. L'anemia, considerata un riscontro comune in corso di leishmaniosi²¹, al contrario, è stata registrata per uno solo dei 23 cani (4,3% degli infetti) rispetto al 73,3% riportato in precedenza²¹. I parametri urinari o renali non sono stati monitorati sebbene sia noto che l'insufficienza renale è una delle principali cause di morte nei pazienti leishmaniotici²¹; tuttavia i segni clinici, l'esame ematologico e il profilo elettroforetico delle proteine sieriche possono essere considerati come parametri indiretti per assumere informazioni sullo stato renale dei cani²¹. Due cani, sottoposti a trattamento, oltre che guarire clinicamente, sembra che abbiano operato una clearance parassitaria in quanto sono risultati negativi ad ogni test nei successivi campionamenti. Questo potrebbe essere un dato interessante visto che è stato riportato che le terapie anti-*Leishmania* spp. attualmente in uso non garantiscono nei cani la guarigione parassitologica^{15,22}. La guarigione parassitologica post-terapia negli animali malati è stata comunque definita un evento possibile benché raro²³. Tuttavia, la presenza del parassita in forma latente, eventualmente rilevabile attraverso mezzi diagnostici differenti e in campioni tissutali diversi, non può essere esclusa così come non può essere escluso un ritorno di positività se si fossero effettuati ulteriori campionamenti. Solo il 26% degli animali monitorati hanno sviluppato un quadro clinico-patologico associato a leishmaniosi sintomatica progressiva, mentre i restanti sono rimasti asintomatici o paucisintomatici. Questo dato si trova in accordo con la percentuale di cani asintomatici registrata in Brasile (85,3%)³. I risultati di questo studio longitudinale confermano una elevata variabilità, nelle aree endemiche, dell'evoluzione dell'infezione da *L. infantum* nei cani e sottolineano la difficoltà di proporre un sistema chiaro per definire lo status dell'infezione attraverso campionamenti effettuati in un unico tempo. Quindi, per comprendere meglio il decorso clinico di questa patologia in ciascun cane, è consigliabile continuare a monitorare nel tempo gli animali infetti al fine di facilitare ogni decisione anche riguardo l'inizio di un'eventuale terapia.

Parole chiave

Cane, infezione naturale, *Leishmania infantum*, studio longitudinale.

■ **Time course of *Leishmania infantum* infection in naturally infected dogs in endemic area**

Summary

Introduction and aim of the study - The clinical evolution of *Leishmania infantum* infection in dogs is largely influenced by the host's individual immune response. Few studies have investigated the time-course and clinical evolution of the infection both under experimental and natural conditions. In the present investigation, the time-course of *L. infantum* infection was studied by monitoring clinical and laboratory features in naturally infected animals.

Material and methods - The study starts from 218 dogs resulted negative to diagnostic tests for *L. infantum* on March 2005, of which 23 dogs positivized to one or more diagnostic tests between

November 2005 and March 2006. The infected animals were monitored serologically (IFAT), parasitologically (lymph-node smear microscopical examination, PCR on dermal tissue) and clinically, through a clinical-pathological score, every 4 months till March 2007.

Results - After assessing the diagnostic tests over time and the clinical scores, the time course of infection was defined as transient asymptomatic infection (11 dogs), persistent asymptomatic infection (2 dogs), patent symptomatic infection (8 dogs).

Discussion - The results of this study confirm the high variability of the *L. infantum* infection progression in endemic areas and underline the difficulty to propose a clear method to define the clinical status of the infection with single-time samples. So it's advisable to monitor infected animals over time in order to make easier any clinical interpretation or the beginning of a possible therapy.

Key words

Dog, natural infection, *Leishmania infantum*, longitudinal study.

BIBLIOGRAFIA

1. Gradoni L: An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet. Parasitol.* 100: 87-103, 2001.
2. Paradies P, Capelli G, Cafarchia C, et al: Incidence of canine leishmaniasis in an endemic area of Southern Italy. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 53: 295-298, 2006.
3. Dantas-Torres F, Brandao-Filo PS: Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 48: 151-156, 2006.
4. Dantas-Torres F: The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet. Parasitol.* 149: 139-146, 2007.
5. Michalski EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, et al: Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147: 67-76, 2007.
6. Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, et al: *Leishmania infantum*-specific IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas: evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.* 96: 265-276, 2001.
7. Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, et al: Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1318-1322, 2006.
8. Quinnell R J, Courtenay O, Davidson S, et al: Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 122: 253-261, 2001.
9. Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Lopez-Fuertes L, et al: A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.* 37: 683-693, 2007.
10. Riera C, Valladares JE, Gallego M, 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.
11. Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, et al: Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 55: 23-28, 2003.
12. Otranto D, Paradies P, Lia RP, et al: Efficacy of a combination of 10% imidacloprid / 50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet. Parasitol.* 144: 270-278, 2007.
13. Menard M, Papageorges M: Fine-needle biopsies: how to increase diagnostic yield. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.* 19: 738-740, 1997.
14. Cortes S, Rolao N, Ramada J, et al: PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98: 12-17, 2004.
15. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, et al: Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24: 324-330, 2008.
16. Belkaid Y: A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J. Immunol.* 165: 969-997, 2000.
17. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, et al: Protection against cutaneous leishmaniasis resultin from bites of uninfected sandflies. *Science* 290: 1351-1354, 2000.
18. Nicolas L, Sidjanski S, Colle JH, et al: *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study with laboratory mice. *Infection and Immunity* 68: 6561-6566, 2000.
19. Solano-Gallego L, Fernández-Bellón M, Morelli P, et al: Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J. Comp. Pathol.* 130: 7-12, 2004.
20. Cardoso L, Shallig HD, Cordeiro-da-Silva A, et al: Anti-leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117: 35-41, 2007.
21. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, et al: Clinical considerations on Canine Visceral Leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35: 376-383, 1999.
22. Noli C, Auxilia ST: Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet. Dermatol.* 16 (4): 213-232, 2005.
23. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, et al: Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39: 560-563, 2001.