

SULLA FILARIOSI OCCULTA IN UN'AREA IPERENDEMIKA DEL NORD ITALIA

LUCA ROSSI¹, GIORGIO FEZIA², MARGHERITA CARNEVALE³

¹ Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università di Torino

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Alessandria

³ Veterinario Libero Professionista

Riassunto

La frequenza e i probabili meccanismi della filariosi occulta sono stati studiati in 179 cani di proprietà vissuti in una zona iperendemica del Nord Italia. Alla necropsia, 62 dei cani esaminati (34,6%) albergavano adulti di *Dirofilaria immitis*. Su questi cani è stato realizzato uno studio comprendente la ricerca delle microfilarie circolanti, il conteggio delle macrofilarie e l'analisi della composizione e distribuzione spaziale degli stadi embrionali intrauterini. Ulteriori informazioni anamnestiche sono state ottenute dai proprietari. Dei cani positivi per *D. immitis* 36 (58%) presentavano un'infezione occulta e di questi 8 (22,2%) erano infestati da parassiti di un solo sesso. Dei 28 casi di filariosi occulta in cui erano presenti parassiti dei due sessi, 9 sono stati ricondotti all'uso ripetuto di ivermectina a dosaggio elevato (da 100 a 1.000 mcg/kg p.v.). I restanti 19 casi sono stati ritenuti conseguenza di una reazione immunitaria. Nelle macrofilarie prelevate da cani microfilarie-mici, l'embriogenesi è risultata seguire un andamento progressivo. In quelle ottenute da cani con filariosi occulta in presenza di parassiti dei due sessi si è invece osservata la rarefazione degli stadi embrionali intermedi e la ritenzione delle microfilarie nelle porzioni anteriori dell'utero. Sulla base dei risultati, l'impiego di kit immunodiagnostici viene fortemente raccomandato, a integrazione della ricerca delle microfilarie, per la diagnosi e la gestione della filariosi cardio-polmonare canina.

Summary

A study of occult heartworm infection was carried out in a total of 179 privately owned dogs from a hyperenzootic area in North Italy. Necropsies revealed that 62 (34,6%) of the dogs were positive for *Dirofilaria immitis* adult worms. These positive dogs formed the basis for a study to examine the number and sex of the adult worms, to analyze the composition and spatial distribution of intrauterine embryonic stages and to determine the presence of circulating microfilariae. Additional anamnestic information was obtained from the owners. 36 (58%) of the positive dogs had occult infections and 8 of these (22,2%) had unisexual infections. Of the 28 occult infections where both sexes were present, 9 were traced back to the repeated use of high doses (100 to 1.000 mcg/kg b.w.) of ivermectin. The remaining 19 cases were considered immune-mediated in origin. A progressive pattern of embryogenesis was observed in microfilaraemic controls whereas dogs with dual-sex occult infections exhibited abnormal patterns, characterised by suppression of the intermediate embryogenic stages and the retention of microfilariae in the anterior uterine segments. Based on the results of this survey, the use of immunodiagnostic kits in addition to a microfilaria test is strongly recommended for diagnosis and management of heartworm infection in dogs.

INTRODUZIONE

Da una decina di anni, la diagnostica della filariosi cardio-polmonare canina si avvale di test immunologici (ELISA e di emoagglutinazione) complessivamente più accurati dei test basati sulla ricerca delle microfilarie sanguicole¹⁻³. Nonostante questo dato di fatto, il test di Knott modificato e la filtrazione su membrana sono ancora oggi largamente impiegati per motivi di praticità, economicità e maggior sicurezza, dal momento che una percentuale non

sempre trascurabile di soggetti può presentare microfilarie-mia positiva ed antigenemia negativa^{1, 4, 5}. D'altro canto, optando per l'utilizzo esclusivo di questi ultimi test si rischia di inquadrare erroneamente, come falsi negativi, quei soggetti in cui la presenza di macrofilarie in sede cardiaca e/o polmonare non si accompagna alla presenza di microfilarie circolanti. Detta situazione, comunemente definita filariosi occulta, viene classicamente ricondotta ai quattro meccanismi principali di cui in Figura 1⁶. Ad essi, va ormai aggiunto l'impiego prolungato a scopo profilatti-

- Infestazione in fase di pre-patenza
- Infestazione da parassiti di un solo sesso
- Sterilità delle macrofilarie indotta da farmaci
- Sterilità immuno-mediata delle macrofilarie
- Impiego prolungato di macrolidi a scopo profilattico

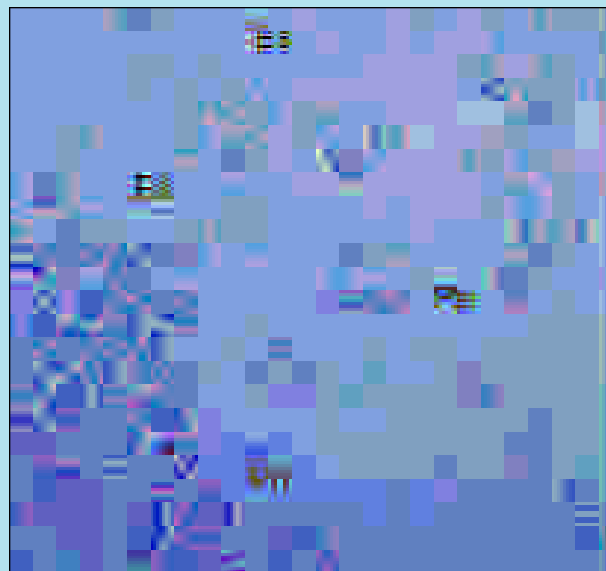
FIGURA 1 - Meccanismi noti di filariosi occulta.

co, quindi a basso dosaggio, della milbemicina ossima e dell'ivermectina in soggetti previamente microfilarie-mici⁷. A fronte della scarsità di dati sulla filariosi occulta raccolti sul territorio nazionale⁸⁻¹¹, ci è parso interessante segnalare la frequenza di questo fenomeno e tentare di inquadrare i meccanismi in un campione costituito da cani di proprietà, provenienti da un'area iperendemica del settore padano occidentale.

MATERIALI E METODI

Nel periodo Novembre 1991-Agosto 1994, è stata eseguita la necropsia di 179 cani di proprietà, inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Sezione di Alessandria, per accertamenti sulla causa di morte. I cani provenivano dal comune di Alessandria e dai comuni di Villabella, Frassineto, Casale Monferrato, Spinetta, Tortona, S. Salvatore, Portanova, S. Giuliano, Valle San Bartolomeo, Fubine, Altavilla, Frugarolo, Quattordio, Valmadonna, Castellazzo, Valenza, Solero, Casalecermelli, Quargnento e Villa del Foro, siti nella pianura alessandrina, fino ad un massimo di 31 km dal capoluogo. Su questi soggetti è stata ricercata la presenza di macrofilarie di *D. immitis* e delle relative microfilarie circolanti. Le macrofilarie sono state evidenziate mediante apertura delle cavità cardiache, delle vene cave e del sistema delle arterie polmonari. In caso di riscontro positivo, le microfilarie venivano contate, suddivise per sesso, misurate al millimetro e successivamente fissate in soluzione di alcool etilico al 70%. Le microfilarie sono state ricercate con metodo di Knott modificato e tipizzate secondo Balbo e Panichi¹², su 5 ml di sangue raccolto in cavità cardiaca o toracica.

Per inquadrare i possibili meccanismi della filariosi occulta nel campione studiato, sono stati contattati telefonicamente i padroni dei cani risultati positivi alla ricerca delle macrofilarie. Grazie alla loro collaborazione sono state raccolte le seguenti informazioni: età del cane, durata del soggiorno nel comune di residenza, frequenza degli spostamenti da detto comune, abitudini (in particolare, dove il cane era solito soggiornare durante la notte), eventuali trattamenti con macrofilaricidi effettuati negli ultimi tre anni di vita; eventuale somministrazione di farmaci ufficialmente registrati per la profilassi della filariosi cardio-polmonare; eventuale somministrazione di farmaci

FIGURA 2- Aspetto degli stadi embrionali di *Dirofilaria immitis* presenti in un segmento di utero fissato in alcool a 70° e successivamente dissezionato. Legenda: Ptz=pretzel; Pri=prelarva; Es=embrione in sviluppo.

non registrati per la profilassi della filariosi cardio-polmonare ma attivi contro le microfilarie ed altri stadi evolutivi di *D. immitis* (in particolare, trattamenti con ivermectina a dosaggio superiore o uguale a 100 mcg/kg, effettuati negli ultimi tre anni di vita). Sulla base dei riscontri parassitologici e di queste informazioni, i cani con filariosi occulta sono stati ripartiti nelle seguenti categorie: a) cani alberganti macrofilarie di un solo sesso; b) cani trattati con ivermectina ad alto dosaggio; c) cani in cui la filariosi occulta va attribuita ad altri meccanismi. Le categorie "cani con infestazione allo stadio di prepatenza" e "cani sottoposti a prolungato trattamento con farmaci ufficialmente registrati per la profilassi della filariosi cardio-polmonare" non sono state considerate in quanto nessuno dei soggetti infestati da *D. immitis* vi è parso inquadrabile.

Inoltre, si è studiata la dinamica dell'embriogenesi in macrofilarie di sesso femminile raccolte sui soggetti Knott-positivi o di controllo (N=155), sui soggetti amicrofilarie-mici precedentemente trattati con ivermectina ad alto dosaggio (gruppo IVOMEC; N=44) e sui soggetti con filariosi occulta "da altra causa" (N=99). Secondo la metodica descritta da Lok *et al.*¹³, le macrofilarie sono state tagliate in 5 segmenti di uguale lunghezza numerati da 1 a 5, con segmento 1 corrispondente all'estremità cefalica e segmento 5 all'estremità caudale del parassita. Ogni segmento è stato ulteriormente suddiviso in 4-5 porzioni e il contenuto uterino svuotato, mediante modica pressione, in un vetrino d'orologio contenente alcune gocce di soluzione fisiologica. Allo stereomicroscopio, sono state classificate 100 forme intrauterine/segmento in 4 stadi così definiti¹⁴: a) prelarva (da uovo non fertilizzato a uovo contenente una morula); b) embrione sviluppato (da uovo contenente una morula invaginata a uovo contenente un embrione disposto circolarmente, con estremità anteriore e posteriore in contatto); c) pretzel (da uovo contenente un embrione con estremità anteriore e posteriore chiaramente sovrapposte a uovo contenente una microfilaria arrotondata al suo interno); d)

microfilaria p.d. (microfilaria pienamente formata e libera da involucro). L'aspetto di alcuni stadi embrionali, quale risulta dopo dissezione di materiale previamente fissato, è riportato in Figura 2.

In base all'analisi del contenuto uterino, le singole macrofilarie sono state a loro volta ripartite in: a) normali (sviluppo embrionale progressivo in senso caudo-craniale); b) gravide immature (sviluppo embrionale progressivo in senso caudo-craniale ma assenza di microfilarie); c) a gradiente discontinuo (sviluppo embrionale non progressivo e/o assenza di uno o più stadi embrionali); d) microfilarie ritenute (maggior percentuale relativa di microfilarie nel segmento 1 e/o maggior presenza delle stesse nei segmenti caudali). I dati grezzi relativi alle macrofilarie raccolte in soggetti facenti parte di uno stesso gruppo sono stati sommati e restituiti sia come percentuale di ogni stadio sul totale delle forme intrauterine conteggiate sia come percentuale di ogni stadio in un determinato segmento del parassita. Quest'ultimo tipo di dati viene presentato graficamente in forma di "embriogramma".

RISULTATI

Sono state trovate macrofilarie in 62 cani su 179 (34,6%). In 32 soggetti le macrofilarie erano presenti solo nel cuore destro; nei restanti 30 anche nelle diramazioni dell'arteria polmonare. I cani infestati (30 maschi e 32 femmine) erano di età media pari a 7,52 anni (mediana 5,36; range 9 mesi-14 anni). Non sono emerse differenze

di età fra maschi e femmine infestati (Mann-Whitney test; $P=0,622$). La grande maggioranza dei soggetti infestati viveva in permanenza all'aperto (59 su 62, pari al 95,1%) e non si spostava mai o si spostava raramente dal luogo di residenza (53 su 62, pari all'85,5%). La distribuzione del numero di parassiti/ospite è risultata di tipo aggregato o sovradisperso (Fig. 3). Il numero medio di macrofilarie per individuo infestato è risultato pari a 16,7 (range 1-136). Anche in questo caso, non si sono osservate differenze significative fra maschi e femmine (Mann-Whitney test; $P=0,773$); il dato non è stato analizzato in rapporto all'età, a causa del numero insufficiente di soggetti giovani.

Dei 62 soggetti positivi per macrofilarie, ben 36 (58%) sono risultati negativi per la ricerca delle microfilarie circolanti e, di conseguenza, sono stati considerati casi di filariosi occulta. La frequenza di detti casi non è parsa subire variazioni significative in rapporto al sesso (19 maschi contro 17 femmine) e alla stagione dell'anno (Test del Chi-quadro; $P=0,601$). L'età dei soggetti con filariosi occulta non differiva significativamente dall'età dei soggetti microfilarie-mici (Mann-Whitney test; $P=0,370$). Al contrario, il numero medio di macrofilarie nei cani con infestazione occulta (media=10,58, mediana=6,50) differiva significativamente da quella dei cani con infestazione patente (media=24,96, mediana=16,50) (Mann-Whitney test; $P=0,004$). In 4 dei 26 soggetti Knott-positivi (15,4%) erano contemporaneamente presenti microfilarie di *D. immitis* e *D. repens*. Dei restanti 117 cani negativi per macrofilarie, uno è risultato positivo per microfilarie di *D. immitis* e *D. repens* ed un secondo per microfilarie di *Dipetalonema reconditum*.

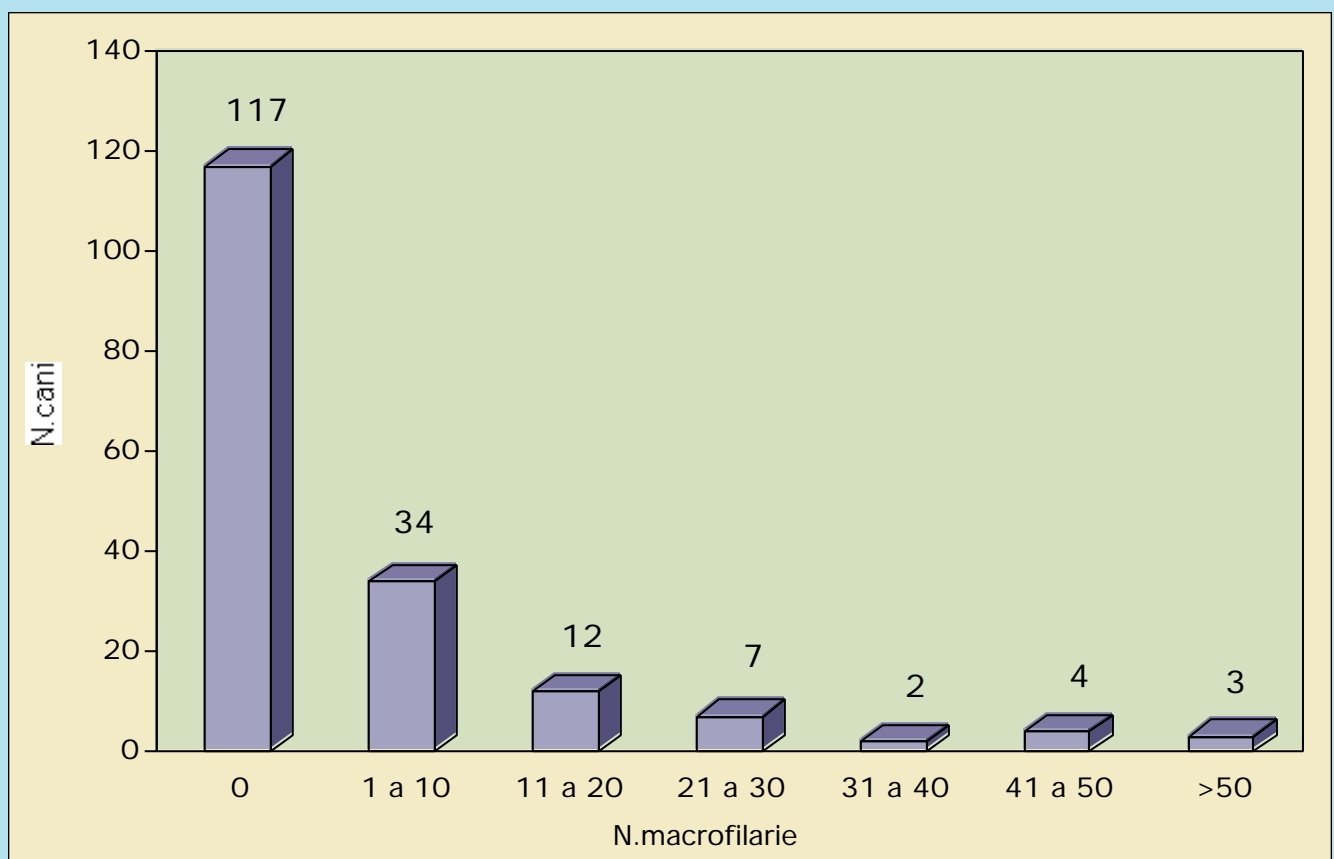


FIGURA 3 - Distribuzione di 1035 macrofilarie di *D. immitis* in 179 cani della provincia di Alessandria.

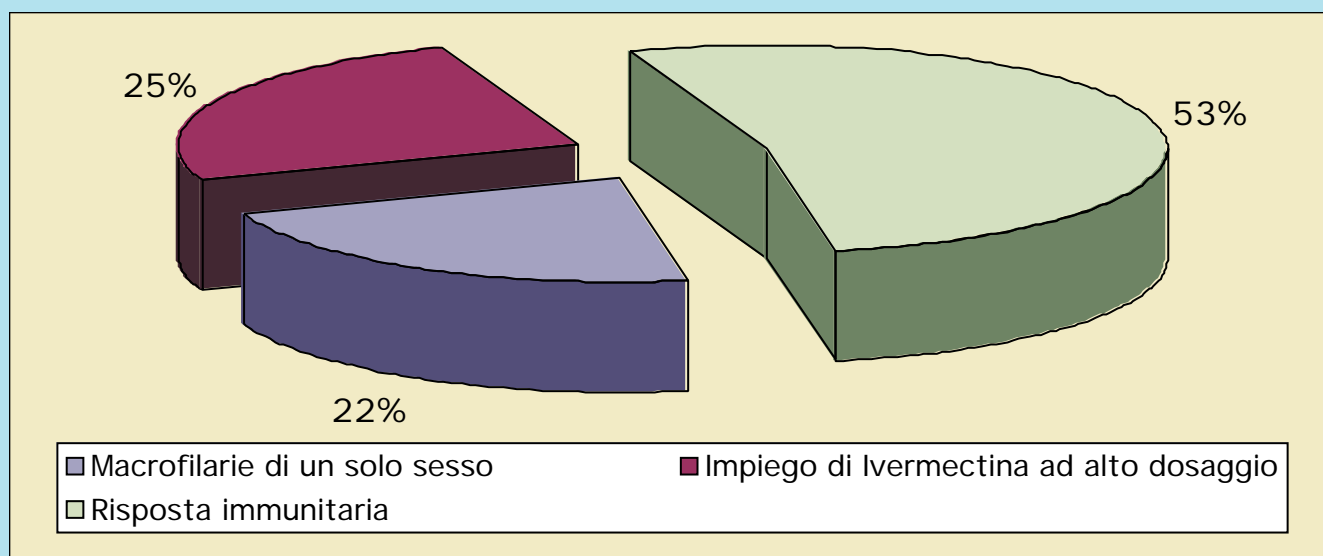
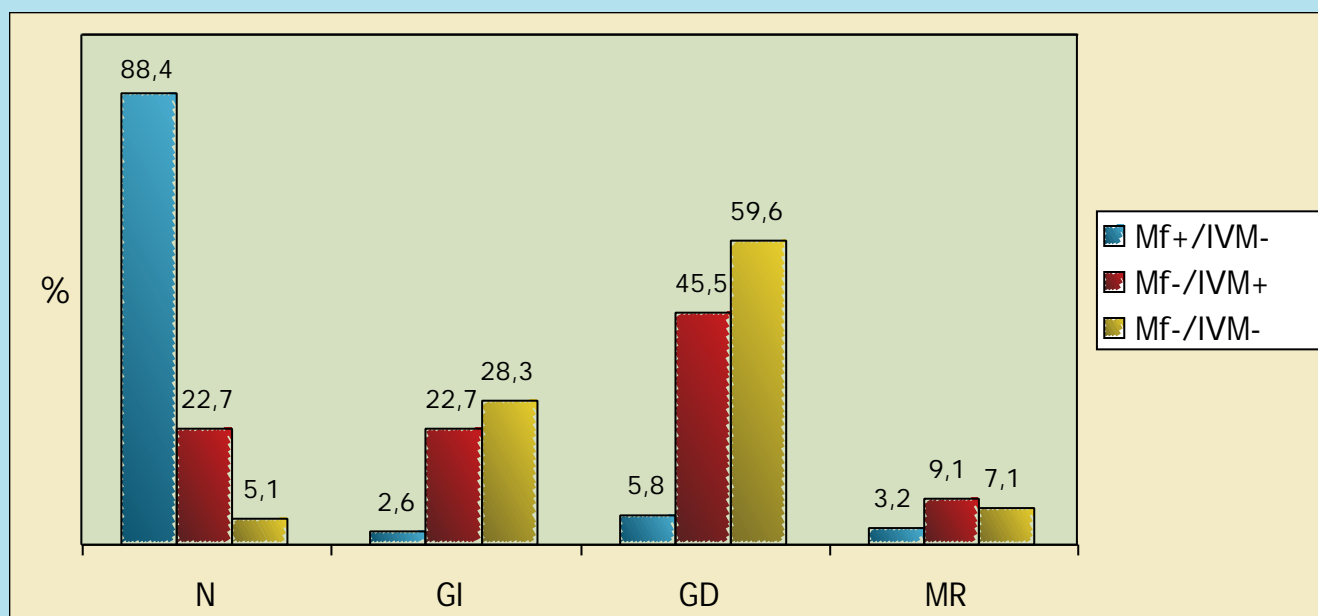


FIGURA 4 - Probabili cause di filariosi occulta in 62 cani della provincia di Alessandria.

FIGURA 5 - Classificazione morfo-funzionale di 298 macrofilarie in cani con o senza microfilarie circolanti (Mf+/Mf-) e trattati o meno con Ivermectin (IVM+/IVM-).
Legenda: N=Normali; GI=Gravide Immature; GD=Gradiente discontinuo; MR=Microfilarie ritenute.

Come da Figura 4, dei 36 soggetti con filariosi occulta, 8 (22,2%) albergavano macrofilarie di un solo sesso (in 2 casi solo maschi, nei restanti 6 solo femmine). In questi soggetti, l'infestazione aveva intensità media pari a 2,5, con range 1-6 parassiti. Altri 9 soggetti amicrofilarie (25,0%) risultavano essere stati trattati, ogni 6 mesi circa, con ivermectina a dosaggi compresi fra 100 e 1.000 mcg/kg; in due casi l'inoculazione del farmaco era stata molto ravvicinata rispetto al momento della necropsia (rispettivamente 14 e 43 giorni prima). In questi soggetti, il numero medio di macrofilarie era pari a 11,1, con range 3-27. Per i restanti 19 cani con filariosi occulta (52,8%), si è ritenuto che la condizione dovesse attribuirsi a causa diversa da quelle sopra richiamate. In questi soggetti, il numero medio di macrofilarie era pari a 13,7, con range 2-51 parassiti; detta intensità media è risultata

superiore rispetto ai soggetti con infestazione unisessuale (Mann-Whitney test; $P=0,001$), non significativamente differente rispetto ai soggetti trattati con ivermectina ($P=0,824$), tendenzialmente ma non significativamente inferiore rispetto ai soggetti microfilarie (P=0,098). I soggetti del gruppo IVERMECTIN erano di età significativamente inferiore rispetto ai soggetti microfilarie (5,44 contro 7,85 anni; Mann-Whitney test: $P=0,043$) e tendenzialmente, ma non significativamente inferiore rispetto ai soggetti con infestazione unisessuale e con filariosi occulta "da altre cause" (Kruskal-Wallis test: $P=0,077$).

In Figura 5 è riportata, per 3 gruppi di soggetti (gruppo IVERMECTIN, amicrofilarie "da altra causa" e microfilarie-mici o di controllo), la classificazione delle macrofilarie di sesso femminile in base all'analisi del contenuto uterino.

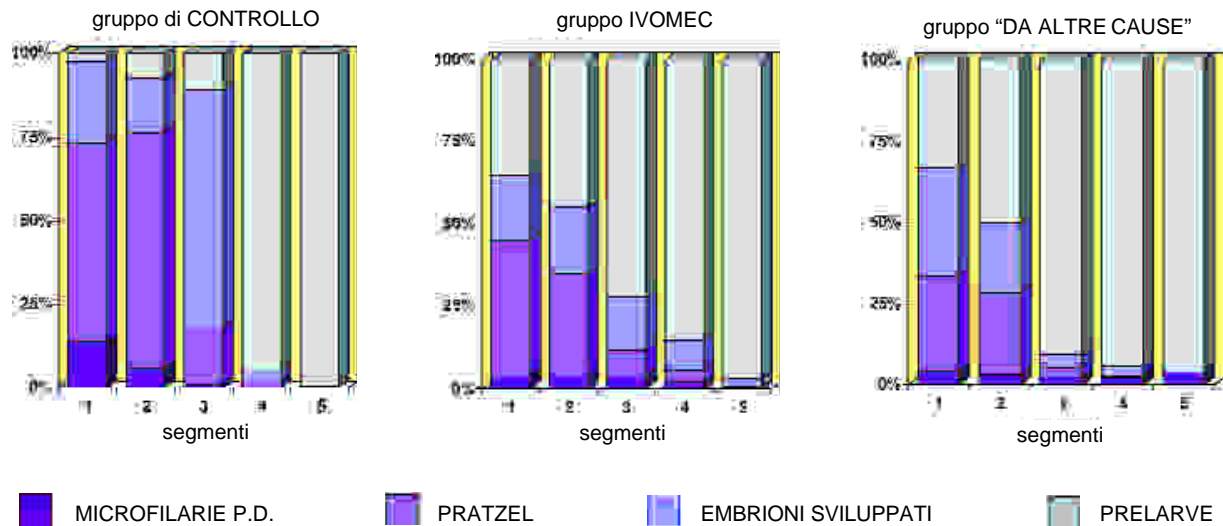


FIGURA 6 - Embriogrammi relativi a macrofilarie raccolte in soggetti microfilariemici (gruppo di controllo), amicrofilarie a seguito di trattamento con ivermectine ad alto dosaggio (gruppo Ivomec), amicrofilarie a seguito di risposta immunitaria (gruppo "da altre cause"). La numerazione dei segmenti delle macrofilarie è da intendersi in senso cranio-caudale.

Tabella 1
Composizione percentuale delle forme intrauterine in macrofilarie raccolte da soggetti microfilariemici (gruppo di controllo), amicrofilarie a seguito di trattamento con Ivermectina ad alto dosaggio (gruppo Ivomec®), amicrofilarie a seguito, verosimilmente, di risposta immunitaria (gruppo da "altre cause").
Il numero di forme intrauterine conteggiate è riportato in parentesi

Gruppo	N. macrofilarie esaminate	Microfilarie p.d.	Pretzel	Embrioni sviluppati	Prelarve
DI CONTROLLO	155	4.1 (3185)	29.8 (23095)	23.3 (18042)	42.8 (33170)
IVOMEC®	44	2.8 (607)	16.8 (3687)	13.7 (3018)	66.8 (14687)
ALTRE CAUSE	99	3.3 (1633)	11.5 (5712)	12.3 (6108)	72.8 (36046)

In particolare, si evidenzia come le macrofilarie con sviluppo embrionale progressivo, e quindi "normale", costituiscano una minoranza tanto nel gruppo IVOMEC come nel gruppo degli amicrofilarie "da altre cause". Differenze sostanziali fra il gruppo di controllo e i due gruppi di soggetti amicrofilarie emergono anche dall'analisi dei dati presentati in Tabella 1 e Figura 6.

DISCUSSIONE

Secondo indagini effettuate in Giappone, Australia e Stati Uniti¹⁵, dal 10 al 67% dei cani infestati da *D. immitis* sono amicrofilarie. Due indagini più recenti, realizzate in Giappone su un totale di 525 cani randagi¹⁶⁻¹⁷, forniscono una percentuale di filariosi occulta pari al 25%. In Spagna, su 17 cani randagi con infestazione naturale da *D. immitis*, solo 6 (35%) presentano microfilarie¹⁸. Per quanto concerne l'Italia, Capelli *et al.*¹⁰ riportano l'assenza di microfilarie circo-

lanti in 30 su 117 cani randagi macrofilaria-positivi della provincia di Padova (25,6%) mentre Genchi *et al.*¹¹ osservano un'aumentata frequenza dei casi di filariosi occulta in cani del Nord Italia esaminati fra il 1986 e il 1988 (dal 18 al 41%, su un totale di 252 soggetti di proprietà); dal momento che la presenza di macrofilarie era stata qui stabilita sulla base di un test ELISA "di prima generazione" (CITE Semi-Quant, IDEXX Co.), altamente specifico ma poco sensibile a fronte di infestazioni di entità inferiore a 6 macrofilarie^{3, 19}, è verosimile che la frequenza dei casi di filariosi occulta fosse addirittura superiore. Analoga considerazione vale per la percentuale di filariosi occulta (17%) indicata da Poglayen *et al.*⁹, relativamente a un campione di 275 cani di proprietà in Veneto e Friuli-Venezia Giulia. Pari al 22,3% è infine la percentuale di filariosi occulta indicata, da Pietrobelli *et al.*¹¹, per un campione di 199 cani di proprietà in Friuli-Venezia Giulia. In ogni caso, la frequenza del 58% di soggetti con filariosi occulta, di cui alla presente indagine, si colloca fra i valori più alti reperibili in letteratura.

Nell'ambito del nostro campione, il 12,9% delle infestazioni da *D. immitis* (e il 22,2% delle infestazioni occulte) è dovuto a parassiti di un solo sesso. Altre due indagini svolte in Italia testimoniano che le infestazioni unisessuali costituiscono una porzione non trascurabile, e relativamente costante, sul totale delle positività per *D. immitis*. Nel campione di 175 cani esaminati da Martini *et al.*³, le infestazioni unisessuali erano 15, pari al 12,8% dei soggetti macrofilaria positivi (e al 50% dei casi di filariosi occulta). Nel campione di 31 cani esaminati da Di Sacco⁴, dette infestazioni erano 5, pari al 16,1% dei positivi.

L'uso di ivermectina in formulazioni diverse da quelle in commercio per la prevenzione delle filariosi canine è responsabile di un quarto dei casi di filariosi occulta da noi evidenziati. È noto ai veterinari pratici come questo principio attivo venga frequentemente impiegato in forma iniettabile (Ivomec®) e a dosaggi talora ingiustificatamente elevati contro numerosi parassiti interni ed esterni del cane. Fra i vari utilizzi dell'ivermectina iniettabile vi sono anche quelli come microfilaricida (è indicato un dosaggio pari a 50 mcg/kg) e come preventivo della filariosi cardio-polmonare, ciò rappresenta un'alternativa impropria ma economicamente interessante alla somministrazione dei farmaci ufficialmente registrati allo scopo. In cani con infestazione patente da *D. immitis*, dosaggi di ivermectina uguali o superiori a 50 mcg/kg determinano un rapido calo della microfilariaemia e, nella grande maggioranza di casi, la scomparsa delle microfilarie circolanti entro le successive 3-4 settimane²⁰. Questo effetto, reversibile solo nell'arco di diverse settimane o mesi^{21, 22}, viene imputato all'attività microfilaricida e ad un'azione inibente la fertilità tanto dei maschi⁷ come delle femmine adulte^{13, 14, 22}. In effetti, i cani che su base anamnestica sono stati da noi inclusi nel "gruppo IVOMEK", presentano "embriogrammi" profondamente alterati rispetto ai controlli microfilarieici (Fig. 6 e Tab. 1). In particolare, mentre nelle macrofilarie da soggetti Knott-positivi si osserva un progressivo sviluppo delle forme intra-uterine in senso caudo-craniale (dominanza delle prelarve nei segmenti 4 e 5, degli embrioni sviluppati nel segmento 3 e dei pretzel nel segmento 2; microfilarie p.d. presenti quasi esclusivamente nei segmenti 1 e 2), nelle macrofilarie da soggetti del "gruppo IVOMEK" si rilevano una netta preponderanza delle prelarve (66,7% sul totale delle forme intra-uterine), una relativa scarsità delle forme intermedie, mai dominanti nei segmenti 2 e 3, e una modesta presenza di microfilarie p.d. nel segmento 1, compensata in parte da una maggior presenza delle stesse nei segmenti 3 e 4. La tendenza all'accumulo in senso caudale delle microfilarie mature e il decremento delle forme evolutive intermedie sono state descritte da Lok *et al.*^{13, 14} in macrofilarie raccolte su un totale di 9 cani con infestazione naturale da *D. immitis*, trattati per due volte con ivermectina s.c. alla dose di 250 mcg/kg e poi soppressi a 42 e 80 giorni dalla prima inoculazione. Un sensibile decremento delle forme evolutive intermedie, senza peraltro accumulo delle microfilarie in senso caudale, è stato evidenziato da Anantaphruti *et al.*²¹ in macrofilarie da due cani trattati con ivermectina orale alla dose di 200 mcg/kg e poi soppressi a distanza di 4 e 14 settimane. Per quanto di nostra conoscenza non esistono in Italia dati precedenti sulla frequenza dei casi di filariosi occulta riconducibili all'uso di ivermectina ad alto dosaggio. L'elevata frequenza di questi casi nella popolazione canina

oggetto di indagine conferma precedenti preoccupazioni^{8, 23} sulle conseguenze che l'uso eccessivamente frequente o poco professionale di questo principio attivo può avere sul piano diagnostico e, di conseguenza, sulla corretta gestione del problema "filariosi" nel nostro Paese.

Per esclusione i restanti 19 casi di filariosi occulta, da noi provvisoriamente inquadrati nella categoria "da altre cause", potrebbero ascrivere a meccanismi di natura immunitaria. È dimostrato che tanto in condizioni sperimentali²⁴ come in condizioni naturali^{6, 25}, alcuni cani elaborano anticorpi in grado di legarsi alle microfilarie circolanti, favorendone l'aggressione da parte dei leucociti e la successiva distruzione a livello dei capillari polmonari. Gli anticorpi anti-microfilarie sono svelabili mediante immuno-fluorescenza indiretta o IFAT²⁴, un test non attualmente disponibile in Italia; è inoltre possibile rilevarne la presenza, anche a livello ambulatoriale, mediante il "test di agglutinazione delle microfilarie", di cui in Wong²⁶. In questi soggetti le microfilarie, anche se non presenti nel circolo periferico, sono evidenziabili nell'utero dei parassiti adulti raccolti in sede necroscopica^{6, 27}; anche nel nostro campione, il 71,7% delle femmine di *D. immitis* raccolte in soggetti con filariosi occulta "da altre cause" conteneva microfilarie. Non tutti i casi di filariosi occulta in presenza di parassiti adulti dei due sessi, e in assenza di trattamenti con ivermectina o milbemicina ossima, sono peraltro imputabili al meccanismo della rimozione immuno-mediata delle microfilarie circolanti. Lo lascia supporre il fatto che in cani con filariosi occulta, quale sopra definita: a) possono reperirsi femmine adulte il cui utero non contiene microfilarie²⁸; b) non sempre sono svelabili anticorpi anti-microfilarie²⁵. A questi rilievi si aggiunga che la presenza di siero ottenuto da cani con filariosi occulta immuno-mediata, oltre a deprimere il metabolismo di esemplari adulti di *D. immitis* mantenuti *in vitro*, inibisce la produzione e liberazione di microfilarie da parte degli stessi; produzione di microfilarie che è in grado di riprendere a breve intervallo dal loro riposizionamento in un mezzo colturale privo di siero iperimmune²⁶. Dunque, la risposta immunitaria sarebbe in grado di condizionare non solo la sopravvivenza delle microfilarie circolanti ma anche i processi che conducono alla loro formazione. Le osservazioni di cui sopra trovano riscontro nella nostra casistica. Infatti, nelle macrofilarie da soggetti appartenenti al gruppo "filariosi occulta da altre cause", l'embriogenesi appare profondamente alterata, come testimoniato dall'elevata percentuale di macrofilarie "a gradiente discontinuo" (59, pari al 59,6% di quelle esaminate) (Fig. 5). È possibile inoltre osservare, come per il "gruppo IVOMEK", una netta preponderanza delle prelarve (72,8% sul totale delle forme intra-uterine), una relativa scarsità delle forme intermedie, mai dominanti nei segmenti 2 e 3, e una modesta presenza di microfilarie allungate nel segmento 1, compensata in parte da una maggior presenza delle stesse nei segmenti da 3 a 5 (Fig. 6 e Tab. 1). Merita ricordare che la minor fecondità e un'attività metabolica ridotta costituiscono effetti ben noti della risposta immunitaria nei confronti di numerosi nematodi²⁹. Resta da chiarire attraverso quali meccanismi l'immunità possa, nel caso di *D. immitis*, interferire a livello dell'embriogenesi; altrettanto interessante sarebbe capire se le analogie fra gli "embriogrammi" dei gruppi "IVOMEK" e "filariosi occulta da altre cause" siano dovute al caso o se l'azione di macrolidi ed immunità converga effettivamente su un bersaglio comune, come ipotizzato da Bennet *et al.*³⁰.

La frequenza dei casi di filariosi occulta, da noi messa in evidenza, non è necessariamente rappresentativa della realtà riscontrabile nell'area iperendemica della Pianura Padana. Ad esempio, è ragionevole ipotizzare che i casi riconducibili a meccanismi immuno-mediati siano più frequenti in un campione di popolazione canina, quale il nostro, con età media relativamente elevata. Si può inoltre supporre che esistano aree dove l'uso (o abuso) di ivermectina ad alto dosaggio sia più contenuto che nell'Alessandrino. Ma, nonostante qualche dubbio sulla rappresentatività del nostro campione, ciò che emerge è una situazione in grado di mettere seriamente alla prova le capacità diagnostiche del veterinario pratico che a fronte di un cane non sottoposto in precedenza a profilassi (intesa come somministrazione mensile di macrolidi per via orale) e risultato negativo a un test di ricerca delle microfilarie, dovrà oggi ricorrere necessariamente ad un test sierologico con caratteristiche di elevata specificità e sensibilità, eventualmente integrato da una radiografia toracica o altre indagini strumentali specialistiche³¹. Le indicazioni di cui sopra valgono, a maggior ragione, tenendo presente che sono amicrofilarie mi buona parte dei cani affetti da cor pulmonale³², "sindrome della vena cava"³³ e "polmonite allergica", una forma dovuta primariamente all'infiltrazione di eosinofili attorno a microfilarie intrappolate nei capillari polmonari³⁴. Relativamente al nostro campione, 16 dei 62 cani con filariosi occulta albergavano più di 20 macrofilarie e, di questi, 3 ne albergavano più di 50; è dunque verosimile che in alcuni di questi cani fossero riconoscibili i sintomi della filariosi ai cd. stadi 2 e 3³⁵⁻³⁶. Una rassegna quanto mai interessante dei kit diagnostici in commercio, con valutazioni critiche sulle loro caratteristiche e sulla loro maneggevolezza, è reperibile in McTier *et al.*².

Parole chiave

Filariosi cardio-polmonare, filariosi occulta, macrolidi, immunità.

Key words

Heartworm disease, occult filariosis, macrolides, immunity.

Bibliografia

- Courtney C.H., Zeng Q., MacKinnon B.R. Comparison of two antigen tests and the modified Knott's test for detection of canine heartworm at different worm burdens. *Canine Practice*, 18, 5, 1993.
- McTier T.L., McCall J.W., Supakorndej N. Features of adult heartworm antigen test kits. In: Soll M.D. Ed., *Proceedings of the Heartworm Symposium '95*, Batavia, IL, American Heartworm Society, 115, 1995.
- Martini M., Capelli G., Poglayen G., Bertotti F., Turilli C. The validity of some haematological and ELISA methods for the diagnosis of canine heartworm disease. *Veterinary Research Communications*, 20, 331, 1996.
- Di Sacco B., Capelli G., Traldi G. Impiego di un nuovo test sierologico di agglutinazione (VetRED) nella diagnosi della filariosi cardio-polmonare del cane. *Atti SISVET*, 46, 1459, 1992.
- Di Sacco B. Utilizzo del CITE Semi-Quant, dello Snap e del PetChek nella diagnosi della filariosi cardio-polmonare del cane. *Veterinaria*, 9, 117, 1995.
- Rawlings C.A., Dawe D.L., McCall J.W., Keith J.C., Prestwood A.K. Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *JAVMA*, 180, 1323, 1982.
- Lok J.B., Knight D.H. Macrolide effects on reproductive function in male and female heartworms. Implications for diagnosis and treatment. In: Soll M.D. Ed., *Proceedings of the Heartworm Symposium '95*, Batavia, IL, American Heartworm Society, 165, 1995.
- Genchi C., Vezzoni A., Di Sacco B., Baroni G. La dirofilariosi cardio-polmonare del cane: epidemiologia e profilassi. *Veterinaria*, 5, 83, 1991.
- Poglayen G., Martini M., Bomben L., Roda R. An updating of the occurrence of canine heartworm disease in Northern Italy. *Veterinary Research Communications*, 20, 303, 1996.
- Capelli G., Poglayen G., Bertotti F., Giupponi S., Martini M. The host-parasite relationship in canine heartworm infection in a hyperendemic area of Italy. *Veterinary Research Communications*, 20, 320, 1996.
- Pietrobelli M., Soldano F., Frangipane di Regalbono A., Bandera C. Filariosi cardio-polmonare del cane in Friuli-Venezia Giulia. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 1, 63, 1998.
- Balbo T., Panichi M. La filariosi del cane. *Epizootologia e diagnosi di laboratorio*. La Nuova Veterinaria, 44, 18, 1968.
- Lok J.B., Knight D.H., Ramadan E. Effects of ivermectin on embryogenesis in *Dirofilaria immitis*: age structure and spatial distribution of intrauterine forms as a function of dosage and time posttreatment. In: Soll M.D. Ed., *Proceedings of the Heartworm Symposium '89*, Batavia, IL, American Heartworm Society, 85, 1989.
- Lok J.B., Harpaz T., Knight D.H. Abnormal patterns of embryogenesis in *Dirofilaria immitis* treated with ivermectin. *Journal of Helminthology*, 62, 175, 1988.
- Otto G.F. The significance of microfilaremia in the diagnosis of heartworm infection. In: Otto G.F. Ed., *Proceedings of the Heartworm Symposium '77*, Bonner Springs, KS, Veterinary Medicine Publishing Co, 22, 1978.
- Uga S., Matsumura T., Ishibashi K., Yotomi K., Yoda Y., Kataoka N. Occult infection of *Dirofilaria immitis* in stray dogs captured in Hyogo Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Parasitology*, 39, 5, 425, 1990.
- Tada Y., Ohta T., Soohara S., Suzuki Y. Helminth infections of dogs in Shiga, Japan with reference to occult infection of *Dirofilaria immitis*. *J. Vet. Med. Sci.*, 53, 359, 1991.
- Castillo Hernandez J.A., Lucientes Curdi J., Estevez Sanchez C., Gortazar Smith C. Epidemiologia de la dirofilariosis en Zaragoza. I. Estudio de la prevalencia en perro y zorro y su interrelación. *Actas VI Congreso Nacional Y I Congreso Ibero de Parasitología*, Caceres (E), 129, 1989.
- Di Sacco B., Baroni G., Monge F., Vezzoni A., Genchi C. Impiego di un test ELISA nella diagnosi della filariosi cardio-polmonare del cane. *Veterinaria*, 3, 93, 1989.
- Jackson R.F. Microfilaricides. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)*, 2, 44, 1987.
- Blair L.S., Campbell W.C. (1979). Efficacy of Avermectin B1a against microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *Am. J. Vet. Res.*, 40, 1031, 1979.
- Anantaphruti M., Kino H., Terada M., Ishii A.I., Sano M. Studies on chemotherapy of parasitic helminths (XIII). Efficacy of ivermectin on the circulating microfilaria and embryonic development in the female worm of *Dirofilaria immitis*. *Japanese Journal of Parasitology*, 31, 517, 1982.
- Poglayen G., Capelli G., Roda R., Calvi N., Zanangeli A. Indagini sulla diffusione della filariosi del cane in alcuni comuni dell'Emilia Romagna. *Atti IV Seminario SCIVAC: Filariosi*, 67, 1988.
- Wong M.M., Suter P.F. Indirect fluorescent antibody test in occult dirofilariosis. *Am. J. Vet. Res.*, 40, 414, 1979.
- Grieve R.B., Glickman L.T., Bate A.K., Mika-Grieve M., Thomas C.B., Patronek G.J. Canine *Dirofilaria immitis* infection in a hyperenzootic area: examination by parasitologic findings at necropsy and by two serodiagnostic methods. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 329, 1986.
- Wong M.M. Studies on microfilaremia in dogs. II. Levels of microfilaremia in relation to immunologic responses of the host. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13, 66, 1964.
- Webber W.A.F., Hawking F. Experimental maintenance of *Dirofilaria repens* and *D. immitis* in dogs. *Experimental Parasitology*, 4, 143, 1955.
- Weiner D.J., Bradley R.E. Serologic changes in primary and secondary infections of Beagle dogs with *Dirofilaria immitis*. In "Canine Heartworm Disease: The Current Knowledge". R.E. Bradley (Ed.), University of Florida Press, Gainesville, 77, 1972.
- Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W. Resistance to parasitic diseases. In "Veterinary Parasitology", Longman Scientific & Technical, Burnt Mill, Harlow Essex (UK), 256, 1987.
- Bennet J.L., Williams J.F., Dave V. Pharmacology of ivermectin. *Parasitology Today*, 4, 226, 1988.
- Venco L., Bussadori C., Morini S., Ferrari E. Aspetti elettrocardiografici ed ecocardiografici nel cane e nel gatto. In "La filariosi cardio-polmonare del cane e del gatto". C. Genchi, L. Venco, A. Vezzoni Eds., Edizioni SCIVAC, Cremona, 113, 1998.
- Knight D.H. Heartworm heart disease. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 21, 107, 1977.
- Rawlings C.A. Occult heartworm disease. In "Heartworm disease in dogs and cats". C.A. Rawlings (Ed.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, 231, 1986.
- Castleman W.L., Wong M.M. Light and electron microscopic pulmonary lesions associated with retained microfilariae in canine occult dirofilariosis. *Vet. Pathol.*, 19, 355, 1982.
- Smith R.D. Decision analysis of heartworm diagnostic tests and management options. In: Soll M.D. Ed., *Proceedings of the Heartworm Symposium '89*, Batavia, IL, American Heartworm Society, 147, 1995.
- Vezzoni A., Di Sacco B. Classificazione clinica della filariosi: significato terapeutico e prognostico. *Veterinaria (Supplemento)*, 7, 50, 1993.