

Influenza delle misure preventive sulla prevalenza di leishmaniosi canina in un focolaio identificato in Nord Italia nel 2006

Rudi Cassini¹, Manuela Signorini², Antonio Frangipane di Regalbono², Alda Natale³, Fabrizio Montarsi³, Mauro Zanaica⁴, Michele Brichese⁵, Giulia Simonato², Serena Borgato⁶, Amira Babiker³, Mario Pietrobelli²

¹ Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA), Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italia
rudi.cassini@unipd.it

² Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italia

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia

⁴ Unità Sanitaria Locale, ULSS 17, Regione Veneto, via G. Marconi 19, 35043 Monselice (PD), Italia

⁵ Unità Complessa Sanità Animale e Igiene Alimentare, Dorsoduro 3493, 30123 Venezia, Italia

⁶ Medico Veterinario, Cavalcavia Stati Uniti 14, 35127 Padova, Italia

Parole chiave

Cane, Italia, *Leishmania infantum*, Leishmaniosi canina, Prevenzione, Sieroprevalenza.

Riassunto

La leishmaniosi canina è un'infezione endemica nel bacino del Mediterraneo con una documentata tendenza a diffondersi verso nord. L'uso massiccio di misure di protezione contro i rischi del contatto con i flebotomi (collari e formulazioni *spot-on*) è stato studiato in un focolaio registrato in una zona collinare dei Colli Euganei in Italia nord-orientale nel 2006. Nel 2006 e 2007 sono stati testati i sieri di 449 cani provenienti dalla stessa zona. Trentuno animali (6,9%) sono risultati positivi al test di immunofluorescenza indiretta (IFI). L'analisi dei fattori di rischio ha chiaramente dimostrato come il focolaio fosse limitato alla località di Calaone, situata nel comune di Baone (PD). Per verificare l'efficacia delle misure preventive adottate, nel 2010, 63 cani di Calaone sono stati campionati e i loro proprietari intervistati. In base alle informazioni rilasciate dai proprietari, la protezione dei cani nei confronti della leishmaniosi ha avuto inizio nel 2006 (66,7% dei cani protetti) crescendo negli anni seguenti (90% dei cani protetti). Il valore di sieroprevalenza (4,2%) della classe di cani di età più giovane (<5 anni) è risultato significativamente minore di quello delle altre classi, dimostrando che gli animali nati dopo il 2006 hanno avuto meno probabilità di infettarsi. Inoltre, i valori di sieroprevalenza riferiti esclusivamente ai cani di Calaone sono risultati del 32,4% (23/71) nel 2006-2007 e 20,6% (13/63) nel 2010, mostrando una tendenza decrescente. I risultati ottenuti mostrano un alto livello di sensibilizzazione dei proprietari dei cani e sembrano evidenziare come l'uso pervasivo di collari e *spot-on* agisca positivamente nel ridurre l'intensità di circolazione di *Leishmania infantum*.

Veterinaria Italiana 2013, **49** (2), 151-156. doi: 10.12834/VetIt.2013.492.151.156

Introduzione

Leishmania infantum è un importante ed emergente agente patogeno responsabile di zoonosi (17). Il protozoo è l'agente eziologico della leishmaniosi canina e delle forme cutanea e viscerale della leishmaniosi umana nell'area del bacino del Mediterraneo. La leishmaniosi canina è endemica in molte zone delle coste del Mediterraneo con notevoli variazioni di prevalenza (1, 8, 18).

In Italia è stata dimostrata la tendenza della malattia a diffondersi verso nord (11) con il forte rischio che focolai emergano in altre parti più settentrionali

d'Europa (17). L'uso pervasivo di misure di prevenzione della puntura dei flebotomi (es. collari impregnati con deltametrina o con imidacloprid-10%/flumethrin-4,5%, formulazioni *spot-on* contenenti imidacloprid-10%/permethrin-50%) ha dimostrato di essere un efficace mezzo di prevenzione della leishmaniosi canina e di riduzione della sua incidenza nelle aree endemiche e iperendemiche (6, 10, 14, 16). Nonostante questo tipo di approccio sia da tempo ampiamente utilizzato e promosso nei focolai di recente instaurazione al fine di controllare il diffondersi del parassita, non ci sono studi di campo che ne abbiano dimostrato l'efficacia.

Molti focolai di leishmaniosi canina sono stati descritti in Nord Italia a partire dagli anni '90 (15). Tra questi, un piccolo focolaio è stato prima sospettato e poi confermato in una piccola località della zona dei Colli Euganei nell'Italia nord-orientale. Questo studio riassume i risultati di cinque anni di attività di sorveglianza del focolaio e presenta i risultati preliminari dell'uso massiccio di misure di prevenzione della puntura dei flebotomi per controllare e, possibilmente, eradicare la leishmaniosi canina nella zona.

Materiali e metodi

Area di studio

Nella prima parte dello studio è stato indagato il livello di diffusione di *Leishmania infantum* nella zona collinare a sud dei Colli Euganei, posta nella parte centrale della regione Veneto, nell'Italia nord-orientale (Figura 1). Questa zona presenta caratteristiche climatiche e ambientali peculiari, sostanzialmente differenti da quelle dell'area pianeggiante che la circonda. In particolare, i versanti esposti a sud sono caratterizzati da un clima tipicamente mediterraneo.

Nella seconda parte lo studio si è ristretto nella località di Calaone, Comune di Baone, sempre nella zona a sud dei Colli Euganei (45°14'58"N-11°39'54"E). Calaone è l'unica frazione del comune che si trova sopra i 100 m sul livello del mare (s.l.m.), con altitudine media di 223 m s.l.m. (intervallo 74-377 m s.l.m.) e predominante esposizione verso sud. Secondo i dati forniti dai servizi veterinari locali (ULSS 17), la popolazione canina, registrata all'anagrafe nel 2010, è risultata costituita da 119 cani con una percentuale di animali non registrati stimata intorno al 5%.

Campionamento

La segnalazione di un caso autoctono di leishmaniosi canina e la presenza di *Phlebotomus perniciosus*, do-

cumentate nel 2005 (3), hanno contribuito a far sospettare che la leishmaniosi stesse circolando nel comune di Baone. Il livello di diffusione della parassitosi è stato indagato nel 2006 e nel 2007, quando sono stati analizzati i campioni di sangue prelevati, rispettivamente, da 245 e 229 cani (25 soggetti sono stati testati entrambi gli anni). I proprietari di cani del comune di Baone e dei comuni collinari limitrofi sono stati invitati a far controllare i propri animali, partecipando alle giornate di campionamento gratuito organizzate a maggio 2006 e giugno 2007. Sin dalla prima giornata i proprietari dei cani sono stati invitati a usare misure preventive (collari o *spot-on*) da giugno a ottobre di ogni anno. Inoltre è stato organizzato un incontro informativo nell'ottobre del 2006 per aumentare la consapevolezza della popolazione locale nei confronti della malattia e delle misure di controllo attuabili.

A completamento dello studio, una specifica indagine epidemiologica è stata predisposta nel 2010 per verificare l'efficacia dell'intervento promosso nella località di Calaone, intervistando i proprietari sull'utilizzo delle misure di prevenzione della puntura del flebotomo durante gli anni precedenti. In totale sono stati prelevati campioni da 63 cani e intervistati i rispettivi proprietari.

Analisi di laboratorio

I campioni di sangue sono stati analizzati utilizzando un test di immunofluorescenza indiretta (IFI) eseguito secondo le indicazioni OIE riportate nel *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (13). I titoli $\geq 1:40$ sono stati considerati positivi e indicativi di esposizione al parassita, rivelatori del contatto tra soggetto e flebotomo infetto durante la precedente stagione estiva. Quando possibile, è stato eseguito un esame citologico su aspirato linfonodale dei cani risultati positivi all'analisi sierologica, la colorazione è stata eseguita con kit Diff-Quick® (MedionDiagnostics International Inc., Miami, FL, USA).

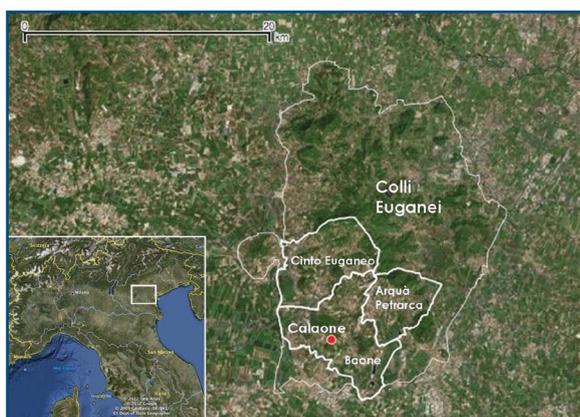


Figura 1. Area di studio. Confini dei comuni coinvolti nello studio (linea bianca spessa) e confini dell'area dei Colli Euganei (linea bianca sottile).

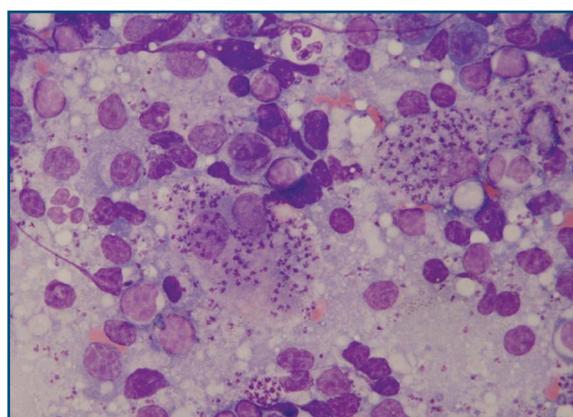


Figura 2. Amastigoti in un aspirato linfonodale risultato positivo e prelevato da un cane residente nella località di Calaone, comune di Baone (PD).

Analisi statistica

L'analisi ha coinvolto 449 cani controllati nel 2006 e nel 2007 (i soggetti prelevati entrambi gli anni sono stati considerati una sola volta). Si è proceduto con un'analisi dei fattori di rischio per valutare le eventuali differenze di sieroprevalenza tra animali di diverso sesso, con diverso stile di vita (cani da compagnia e da caccia/guardia), appartenenti a diverse classi d'età (<5; 5-7; >7 anni), provenienti da diversi comuni (Arquà Petrarca, Baone, Cinto Euganeo) o residenti in zone a diversa altitudine (pianura: sotto i 100 m s.l.m.; collina: sopra i 100 m s.l.m.). Sono stati anche indagati quali possibili fattori di rischio: l'abitudine a pernottare nell'ambiente esterno, la convivenza con altri cani e lo spostamento in aree endemiche. Le differenze di sieroprevalenza sono state valutate inizialmente utilizzando una statistica di tipo univariato con il test del Chi-quadrato di Pearson o con il test esatto di Fisher, se maggiormente appropriato. Le analisi statistiche sono state eseguite sia considerando tutti i positivi (soglia $\geq 1:40$), sia considerando positivi solo gli animali con titoli $\geq 1:160$, valori normalmente considerati indicativi di infezione (5). Inoltre, il *dataset* è stato analizzato anche con statistica multivariata, mediante un modello di regressione logistica (9), in modo da verificare quali fossero i potenziali fattori di rischio associati alla sieropositività per *Leishmania infantum* nei due diversi valori di *cut-off* (1:40

o 1:160). Le analisi statistiche sono state eseguite usando PASW Statistic 18 (SPSS Inc.).

Per quanto riguarda i cani monitorati nel 2010 a Calaone (n=63), le differenze di sieroprevalenza tra classi di età (<5; 5-7; >7anni) sono state valutate usando il test del Chi-quadrato di Pearson. La sieroprevalenza ottenuta nel 2010 è stata confrontata con il valore ottenuto dal *dataset* del 2006-2007, ma riferito esclusivamente ai cani provenienti da Calaone.

Risultati

Indagine preliminare (anni 2006-2007)

Su 449 cani controllati, 31 (6,9%) sono risultati sieropositivi ($\geq 1:40$). Dei soggetti positivi 29 cani sono risultati provenire dal Comune di Baone, in particolare, 24 dalla località di Calaone. Solo per un soggetto l'anamnesi ha riportato lo spostamento in area endemica.

La maggior parte dei proprietari si è mostrata riluttante al prelievo di materiale biologico dal proprio cane mediante aspirato linfonodale. In totale sono stati campionati solo 4 cani, di questi 2 sono risultati positivi (Figura 2). I titoli anticorpali dei due cani positivi erano di 1:320 e 1:160.

I risultati delle analisi univariate sono riportati in Tabella I e quelli del modello di regressione logistica

Tabella I. Valori di sieroprevalenza per *Leishmania infantum* in relazione ad alcuni dati epidemiologici della popolazione canina (anni 2006-2007).

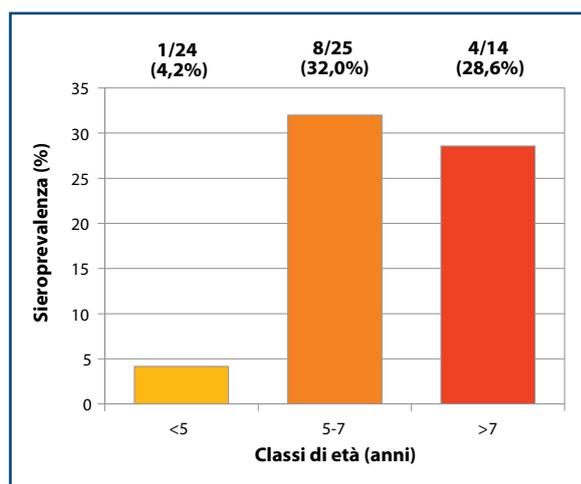
| Fattori di rischio | Numero animali | Esposizione (1:40 <i>cut-off</i>) | | Infezione (1:160 <i>cut-off</i>) | |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|
| | | Positivi | Prevalenza (%) | Positivi | Prevalenza (%) |
| Comune | Arquà Petrarca | 48 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| | Baone | 242 | 29 | 12,0** | 8,3** |
| | Cinto Euganeo | 111 | 1 | 0,9 | 0,0 |
| Altitudine | Pianura | 273 | 6 | 2,2 | 0,7 |
| | Collina | 174 | 25 | 14,4** | 10,3** |
| Pernottamento in ambiente esterno | No | 131 | 6 | 4,6 | 0,8 |
| | Si | 316 | 25 | 7,9 | 6,0* |
| Classi di età (anni) | <5 | 185 | 12 | 6,5 | 4,9 |
| | 5-7 | 123 | 10 | 8,1 | 4,1 |
| | >7 | 133 | 9 | 6,8 | 4,5 |
| Sesso | Maschi | 246 | 16 | 6,5 | 4,1 |
| | Femmine | 199 | 15 | 7,5 | 5,0 |
| Stile di vita | Can da compagnia | 278 | 17 | 6,1 | 3,6 |
| | Can da caccia/guardia | 94 | 9 | 9,6 | 6,4 |
| Convivenza con altri cani | No | 208 | 11 | 5,3 | 4,3 |
| | Si | 238 | 20 | 8,4 | 4,6 |
| Spostamento in area endemica | No | 413 | 30 | 7,3 | 4,8 |
| | Si | 32 | 1 | 3,1 | 0,0 |

** p<0,01; * p<0,05.

Tabella II. Risultati dell'analisi multivariata dei fattori di rischio (anni 2006-2007).

| Fattore di rischio | p value | Odds Ratio | 95% C.I. per O.R. | |
|---|---------|------------|-------------------|-----------|
| | | | Inferiore | Superiore |
| Comune di Baone | <0,001 | 8,718 | 3,181 | 23,890 |
| Area collinare | <0,001 | 4,225 | 2,468 | 7,232 |
| Pernottamento ambiente esterno ^a | 0,026 | 3,332 | 1,158 | 9,592 |

^aConsiderando solo cani positivi con titolo $\geq 1:160$.

**Figura 3.** Valori di sieroprevalenza per *Leishmania infantum* nella popolazione canina in relazione alle classi di età (anno 2010).

in Tabella II. I cani residenti in area collinare, quelli provenienti dal comune di Baone e quelli tenuti a pernottare nell'ambiente esterno hanno mostrato una maggiore probabilità di entrare in contatto con i flebotomi infetti.

Indagine epidemiologica a Calaone (anno 2010)

I proprietari dei cani intervistati nell'indagine del 2010 hanno riferito che l'utilizzo di collari e di *spot-on* efficaci contro i flebotomi aveva avuto inizio nel 2006. Nel primo anno il 66,7% (30/45) dei cani è risultato dotato di misure preventive. Tale percentuale è aumentata negli anni seguenti: 90,0% (45/50) nel 2007, 91,1% (51/56) nel 2008 e 88,9% (56/63) nel 2009.

Nel 2010, su 63 cani campionati, 13 (20,6%) sono risultati positivi. La Figura 3 mostra la differenza dei valori di sieroprevalenza tra le classi d'età. La classe <5 anni presenta un valore (4,2%) significativamente minore ($p < 0,05$) delle altre due classi. Nel 2006-2007, dei 449 soggetti campionati, 71 sono risultati provenienti dalla località di Calaone, di questi 23 (32,4%) sono risultati positivi al test IFI, almeno ad uno dei due campionamenti. La ridu-

zione di sieroprevalenza tra il 2006-2007 e il 2010 è stata dell'11,8%.

Discussione

L'indagine condotta sulla popolazione canina nel 2006-2007 ha dimostrato la presenza di un focolaio di leishmaniosi canina in quest'area meridionale dei Colli Euganei. La residenza in un'area collinare e la provenienza dal comune di Baone sono stati identificati come i due più importanti fattori di rischio, confermando la località di Calaone come centro del focolaio. La mancanza di differenze di sieroprevalenza tra le classi d'età è indicativa di un'infezione di nuova introduzione, quando i soggetti più anziani hanno le stesse probabilità di quelli più giovani di entrare in contatto con il parassita e diventare infetti. Il focolaio è stato dunque descritto come limitato all'area di Calaone e di recente instaurazione (2006).

Utilizzando il *cut-off* 1:160, i cani abituati a pernottare all'esterno sono risultati a maggior rischio. Questo risultato suggerisce che anche i cani tenuti in ambienti interni durante la notte possono avere occasionali contatti con i flebotomi infetti, ma la permanenza all'esterno viene confermata come importante fattore di rischio per lo sviluppo dell'infezione e, conseguentemente, della malattia (4, 12).

I risultati dello studio epidemiologico condotto nel 2010 per valutare la progressione del focolaio sembrano essere incoraggianti anche se risentono della ridotta numerosità del campione.

I dati sull'impiego delle misure di prevenzione della puntura del flebotomo dimostrano come i proprietari dei cani siano stati fortemente sensibilizzati sulla malattia e come gli stessi siano a conoscenza delle corrette misure di controllo dell'infezione.

L'uso diffuso di collari e di *spot-on* sembra agire in modo positivo, come dimostrano la tendenza decrescente della sieroprevalenza e il limitato numero di cani sieropositivi tra i soggetti giovani. Infatti, in tre anni, il valore di sieroprevalenza nella località di Calaone si è ridotto di circa un terzo. Inoltre, considerando gli animali campionati nel 2010, il valore di sieroprevalenza della classe di età più giovane (fino a 4 anni di età) è risultato significativamente più basso di quello delle altre classi, dimostrando che gli animali nati dopo il 2006 (quando è iniziato l'utilizzo di massa delle misure preventive) hanno avuto meno probabilità di essere esposti al parassita rispetto agli animali più anziani (Figura 3).

Questo focolaio, insieme con i numerosi nuovi focolai di leishmaniosi canina segnalati nel Nord Italia (11, 14), conferma l'espansione dell'infezione da *Leishmania infantum* in questa parte del paese, che a ragione deve essere considerata endemica, almeno in buona parte delle proprie aree collinari a clima

Mediterraneo. In letteratura, solo un caso di leishmaniosi umana è stato documentato in Italia nord-orientale (7), ma la presenza di casi sub-clinici e la sottostima di casi di leishmaniosi umana nei report ufficiali potrebbero contribuire a non far emergere una più rilevante circolazione del parassita all'interno della popolazione umana, come riscontrato in Italia nord-occidentale (2). La presenza di aree con elevata prevalenza del parassita all'interno della popolazione canina e la sempre maggiore diffusione geografica suggeriscono un aumento del rischio per la popolazione umana nel prossimo futuro.

Conclusioni

Lo studio descrive l'identificazione di un focolaio di leishmaniosi canina in una piccola località di una zona collinare del Nord Italia, in precedenza considerata indenne dal parassita. Un tempestivo intervento, finalizzato a promuovere l'utilizzo di misure di prevenzione nei confronti della puntura del flebotomo,

è stato messo in atto con successo per arrestare la diffusione del parassita, riducendo la sieroprevalenza nei cani dell'area. I risultati ottenuti confermano che il monitoraggio attivo della leishmaniosi canina è un utile mezzo per allertare i servizi di sanità pubblica e che ogni azione finalizzata a prevenire il diffondersi della malattia nel cane contribuisce a diminuire il rischio per la popolazione umana.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la collaborazione il personale del comune di Baone e i medici veterinari liberi professionisti del territorio.

Finanziamenti

Questo studio è stato supportato da un Progetto di Ateneo dell'Università degli Studi di Padova (Codice progetto CPDA083110) e dalla Regione Veneto.

Bibliografia

- Baneth G., Koutinas A.F., Solano-Gallego L., Bourdeau P. & Ferrer L. 2008. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, **24**, 324-30.
- Biglino A., Bolla C., Concialdi E., Trisciuglio A., Romano A. & Ferroglio E. 2011. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of Northwestern Italy (Piedmont Region) where such infections are traditionally nonendemic. *J Clin Microbiol*, **48**, 131-136.
- Cassini R. 2008. Aspetti epidemiologici e rischi zoonosici delle malattie trasmesse da vettori: Babesiosi e Leishmaniosi in Italia Nord-Orientale. PhD thesis, University of Padova. (http://paduaresearch.cab.unipd.it/794/1/Tesi_Dottorato_Cassini.pdf ultimo accesso 20/5/2013).
- Cortes S., Vazc Y., Nevesd R., Maia C., Cardoso L. & Campino L. 2012. Risk factors for canine leishmaniosis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol*, **189**, 189-196.
- Ferroglio E., Trisciuglio A., Gastaldo S., Mignone W. & Delle Piane M. 2002. Comparison of ELISA IFAT and Western blot for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog. *Parassitologia*, **44**, 64.
- Ferroglio E., Poggi M. & Trisciuglio A. 2008. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health*, **55**, 145-148.
- Gabrielli G.B., Zaia B., Stanzial A.M. & Corrocher R. 2001. Leishmaniosi viscerale: una malattia raramente diagnosticata nel nord Italia. Descrizione di un caso. *Annali Italiani di Medicina Interna*, **16**, 185-191.
- Gramiccia M. 2011. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*, **181**, 23-30.
- Hosmer D.W. & Lemeshow S. 2000. Applied logistic regression, 2nd ed. Wiley, New York.
- Maroli M., Mizzoni V., Siragusa C., D'Orazi A. & Gradoni L. 2001. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniosis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in Southern Italy. *Med Vet Entomol*, **15**, 358-363.
- Maroli M., Rossi L., Baldelli R., Capelli G., Ferroglio E., Genchi C., Gramiccia M., Mortarino M., Pietrobelli M. & Gradoni L. 2008. The northward spread of leishmaniosis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health*, **13**, 256-264.
- Martin-Sánchez J., Morales-Yuste M., Acedo-Sanchez C., Baron S., Diaz V. & Morillas-Marquez F. 2009. Canine Leishmaniosis in southeastern Spain. *Emerg Infect Dis*, **15**, 795-798.
- Office International des Épidémiologies: OIE (World Organisation for Animal Health). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008. Chapter 2.1.8. Leishmaniosis. (http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.08_LEISHMANIOSIS.pdf accessed on 20/05/2013).
- Otranto D., Paradies P., Lia R.P., Latrofa M.S., Testini G., Cantacessi C., Mencke N., Galli G., Capelli G. & Stanneck D. 2007. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniosis in kennel dogs in an endemic area. *Vet Parasitol*, **144**, 270-278.

15. Otranto D., Capelli G. & Genchi C. 2008. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasite Vector*, **2**, S2. doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S2.
16. Otranto D., Dantas-Torres F., de Caprariis D., Di Paola G., Tarallo V.D., Latrofa M.S., Lia R.P., Annoscia G., Breitshwerdt E.B., Cantacessi C., Capelli G. & Stanneck D. 2013. Prevention of Canine Leishmaniosis in a Hyper-Endemic Area Using a Combination of 10% Imidacloprid/4.5% Flumethrin. *PLoS One*, **8**. doi: 10.1371/journal.pone.0056374.
17. Ready P.D. 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, **15**, pii=19505. (<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19505>).
18. Solano-Gallego L., Koutinas A., Mirò G., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G. & Baneth G. 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, **165**, 1-18.