

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Veterinarie

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H3

Settore Scientifico disciplinare: VET/06

**Presenza e diffusione della Leishmaniosi e dei suoi vettori
in provincia di Rieti**

Presentata da: Dott.ssa Giulia Barlozzari

Coordinatore Dottorato

Prof. Carlo Tamanini

Relatore

Prof. Giovanni Poglayen

Esame finale anno 2015

INDICE

ABSTRACT	
PREMESSA	1
SCOPO DEL LAVORO	2
PARTE GENERALE	
1. LA LEISHMANIOSI	
1.1 Storia	3
1.2 Classificazione: cenni storici	3
1.3 Specie di Leishmania di interesse medico	5
1.4 Le leishmaniosi umane	6
1.5 Morfologia	7
1.6 Ciclo biologico	8
2. IL VETTORE	
2.1 Caratteristiche generali e ciclo biologico	10
2.2 Identificazione di specie	11
2.3 Specie presenti in Italia	13
3. LA LEISHMANIOSI CANINA	
3.1 Definizione	15
3.2 Epidemiologia	15
3.3 Patogenesi	16
3.4 Sintomatologia	16
3.5 Stadiazione	17
3.5.1 Stadiazione della LCan	17
3.5.2 Stadiazione della CKD	18
3.6 Prognosi	20
3.7 Diagnosi	21
3.8 Terapia	22
3.8.1 Considerazioni generali	22
3.8.2 Molecole	22
3.9 Linee guida del GSLC	26
3.10 Monitoraggio	26
3.11 Profilassi	28
4. L'ANALISI GEOSPAZIALE	29
PARTE SPERIMENTALE	
1. MATERIALI E METODI	32
1.1 Area di studio	32
1.2 Elaborazioni geo-spaziali e statistiche	35
1.3 Fonti dati	36
1.3.1 SIL-IZSLT	36
1.3.2 ACIRL	37
1.3.3 Carta di copertura del suolo	37
1.3.4 BDN	38
1.3.5 Ministro della Salute e ASP	38
1.3.6 Worldclim	39
1.3.7 ARSIAL	39
2. PRESENZA E DIFFUSIONE DI LCan	40
3. PRESENZA E DIFFUSIONE DI LV ED LC	42

4. MONITORAGGIO DEI FLEBOTOMI	42
4.1 Prima stagione di catture	43
4.2 Seconda stagione di catture	44
5. ALLESTIMENTO DEI PREPARATI ED IDENTIFICAZIONE	49
6. RICERCA DI <i>LEISHMANIA</i> SPP. NEI FLEBOTOMI MEDIANTE PCR	49
6.1 Estrazione del DNA	50
6.2 Dosaggio degli acidi nucleici	51
6.3 18S rRNA PCR	51
6.4 16S rRNA nPCR	54
6.5 ITS1 nPCR-RFLP	57
1. RISULTATI	60
1.1 PRESENZA E DIFFUSIONE DI LCan	60
(Dataset 1)	
1.1 Sieroprevalenza grezza per LCan	60
1.2 Sieroprevalenza e altitudine	61
1.3 Sieroprevalenza e Tmed	62
1.4 Sieroprevalenza e Tmin	63
1.5 Sieroprevalenza e copertura % di uliveti	63
1.6 Sieroprevalenza e copertura % di tessuto urbano	64
(Dataset 2)	
1.7 Infezione ed età	65
1.8 Infezione e razza	65
1.9 Infezione e sesso	66
Prevalenza media annuale 2006-2013	66
2. PRESENZA E DIFFUSIONE DI LV ED LC	67
3. MONITORAGGIO DEI FLEBOTOMI	68
3.1 Prevalenza delle specie identificate nell'area di studio	68
3.2 Altitudine	69
3.3 Sex Ratio	69
3.4 Metodo di cattura	69
3.5 Metodo di cattura e Sex Ratio	70
3.6 Metodo di cattura e specie	71
3.7 Densità	72
3.7.1 Talocci	72
3.7.2 Rionasso	74
3.7.3 Piana di Rieti	76
3.8 Dinamica di stagionale	78
3.8.1 Dinamica stagionale e temperatura	79
3.8.2 Dinamica stagionale e umidità	80
3.8.3 Dinamica stagionale e precipitazioni	81
4. RICERCA DI <i>LEISHMANIA</i> SPP. NEI FLEBOTOMI MEDIANTE PCR	82
4.1 Metodi di estrazione	82
4.2 18S rRNA PCR	83
4.3 16S nPCR	84
4.4 ITS1 nPCR-RFLP	85
1. DISCUSSIONE	87
1.1 PRESENZA E DIFFUSIONE DI LCan	87
1.2 PRESENZA E DIFFUSIONE DI LV ED LC	88
1.3 MONITORAGGIO DEI FLEBOTOMI	88
1.4 RICERCA DI <i>LEISHMANIA</i> SPP. NEI FLEBOTOMI MEDIANTE PCR	88

CONCLUSIONI	92
BIBLIOGRAFIA	94
RINGRAZAMENTI	

92
94

Abstract

The aim of this study is to describe the presence and diffusion of leishmaniasis in a province of Central Italy (Rieti) not optimal for the disease transmission for its environmental conditions (dry-cold weather, 70% highlands). We estimated i) Canine raw seroprevalence (2006-2013) and mean annual prevalence ii) cases of visceral and cutaneous leishmaniasis (VL, CL) (2000-2013). Phlebotomine sand flies were trapped during two seasons (2011-2012) and meteorological data and altitude were recorded for each site. The phlebotomines were submitted to *Leishmania* spp detection by PCR. The raw seroprevalence ranged from 0-76,9% and the mean annual prevalence does not show a linear trend. Six cases of VL were detected in Italian patients who reside in the province. Phlebotomine sand flies were found in 5/6 sites until 800 m above s.l., with low density. Four species were identified: *P. perniciosus* (6,4 %), *P. perfiliewi* (1,8%), *P. mascittii* (0,1%) and *S. minuta* (91,7 %). The number of phlebotomines resulted positively correlated ($r=0,69$, $p<0,001$) with the mean daily temperature ($T_{med}^{\circ C}$) while a significant negative correlation ($r=-0,51$, $p<0,05$) was found with mean relative humidity ($U_{med}\%$). *Leishmania* spp. was not detected. These findings suggest the endemic status of leishmaniasis in the province.

Nel presente studio ci si è proposti di valutare la presenza e diffusione della leishmaniosi in una provincia dell'Italia centrale (Rieti) che, per caratteristiche ambientali (prevalentemente montuosa, clima freddo-secco) poco sembra prestarsi al ciclo della malattia. A questo scopo sono stati calcolati: i) sieroprevalenza grezza nella popolazione canina (2006-2013) e prevalenza media annuale ii) casi di leishmaniosi viscerale (LV) e cutanea (LC) (2000-2013). Catture di flebotomi sono state effettuate per due stagioni consecutive (2011-2012) per ogni sito sono stati registrati i dati climatici (temperatura, umidità etc.) ed altitudine. I flebotomi sono stati sottoposti a ricerca di *Leishmania* mediante PCR. La sieroprevalenza grezza per leishmania varia da 0 a 76,9% e la prevalenza media annuale non presenta un trend lineare. Sono stati registrati 6 casi di LV tutti in pazienti italiani tutti residenti in provincia di Rieti. I flebotomi sono stati rilevati in 5 dei 6 siti monitorati fino agli 800 m s.l.m., seppur con basse densità. Sono state identificate le seguenti specie: *P. perniciosus* (6,4 %), *P. perfiliewi* (1,8%), *P. mascittii* (0,1%) e *S. minuta* (91,7 %). È stata rilevata una correlazione statisticamente significativa ($r=0,69$, $p<0,001$) tra numero di flebotomi e temperatura giornaliera ($T_{med}^{\circ C}$) ed una correlazione negativa significativa ($r=-0,51$, $p<0,05$) con l'umidità relativa ($U_{med}\%$). La ricerca di leishmania ha dato esito negativo in tutti i flebotomi analizzati. Questi rilievi suggeriscono l'endemia della leishmaniosi nella provincia di Rieti.

PREMESSA

La leishmaniosi è una zoonosi parassitaria causata da protozoi flagellati del genere *Leishmania*. In Italia la sola specie presente è *L. infantum* appartenente al complex donovani (Fraga et al., 2010), i cui ceppi viscerotropi sono responsabili della leishmaniosi viscerale umana (LV) e della leishmaniosi canina (LCan) mentre i ceppi dermatotropi sono responsabili della leishmaniosi cutanea (LC) nell'uomo. Il parassita è trasmesso da insetti vettori appartenenti al genere *Phlebotomus* (*Diptera*, *Psychodidae*, *Phlebotominae*). Nel nostro paese i vettori accertati sono *P. perniciosus*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus*, *P. ariasi* e il cane risulta essere l'unico serbatoio di rilevanza epidemiologica (Maroli et al., 1995, 1998, 2002; Romi et al., 2012). La leishmaniosi è endemica in 88 paesi (72 dei quali in via di sviluppo) e 12 milioni di persone ne sono affette. La LV umana ha un'incidenza annuale mondiale intorno al mezzo milione di casi (Dujiardin et al., 2008). Ogni anno si verificano 1,5-2 milioni di nuovi casi e 350 milioni di persone sono a rischio di infezione. La Leishmaniosi viscerale causata da *L. donovani* ha provocato più di 100.000 morti in eventi epidemici in Sudan ed in India. *L. infantum*, endemica nel bacino del Mediterraneo è emersa come patogeno opportunistico in pazienti affetti da HIV (Breton et al., 2005). In Italia, secondo gli ultimi dati raccolti dall'Istituto Superiore di Sanità nel periodo 2000-2006, l'incidenza della leishmaniosi si aggira intorno ai 200 nuovi casi umani l'anno per la LV e ai 300 nuovi casi per la forma cutanea (LC) con circa 8 casi di LC e LV importati (Seimenis et al., 2006). I dati sono probabilmente sottostimati, in quanto si calcola che per ogni caso clinicamente manifesto ve ne siano tra i 30 e i 100 casi sub-clinici (Gradoni, 2001) inoltre molti casi non vengono diagnosticati in quanto attribuiti ad altre cause di splenomegalia febbrile. Per quanto riguarda la leishmaniosi canina, si è assistito negli ultimi anni ad un aumento della sua incidenza e diffusione geografica in aree del bacino del Mediterraneo ritenute indenni (Poglayen et al., 1997, Rossi et al., 1999; Ferroglio et al., 2002 Maroli et al., 2008, Baldelli et al. 2011,) e alla sua segnalazione in Nord America (Enserink, 2000, Gaskin et al., 2002 Schantz et al., 2005). Dalle aree tradizionalmente endemiche, zone costiere collinari lungo tutto la penisola ed isole maggiori, l'infezione si è espansa sul versante centro-settentrionale adriatico e in molte aree collinari prealpine e pre-appenniniche del nord Italia. L'elevata suscettibilità al parassita fa sì che il cane

costituisca un eccellente indicatore della diffusione dell'infezione in un'area geografica. L'aumento di incidenza e diffusione è ovviamente associato ad un'espansione dell' areale di distribuzione dei vettori, nelle nostre regioni *P. perniciosus* e *P. perfiliewi*, entrambe appartenenti al sottogenere *Laroussius*. In alcuni focolai del nord Italia sembra avere un ruolo simile la specie *P. neglectus* (Maroli et al., 1995, 2002). All'origine dell' espansione della leishmaniosi sembrano esserci diversi fattori concomitanti: l'aumento della popolazione canina, il fenomeno del randagismo e le mutate condizioni climatico-ambientali (global warming) che hanno permesso ai vettori di colonizzare aree fino a pochi anni fa non idonee allo sviluppo e attecchimento di loro popolazioni stabili.

SCOPO DEL LAVORO

Nel presente studio ci siamo proposti di descrivere alcuni aspetti della leishmaniosi in una provincia della regione Lazio quella di Rieti che, per le sue caratteristiche geografiche e climatico-ambientali, mal si presta al ciclo della malattia in molte aree del suo territorio. In particolare ci si è proposti di

- ▲ valutare la presenza e diffusione della LCan
- ▲ valutare la presenza e diffusione della LV ed LC
- ▲ valutare la presenza e diffusione dei vettori e ricercare l'eventuale presenza di DNA di leishmania al loro interno.
- ▲ confrontare i dati entomologici e di sieroprevalenza della LCan con alcune variabili di tipo ecologico (temperatura, umidità, altitudine, copertura del suolo etc.) o relative al segnalamento (razza, sesso, età).

LA LEISHMANIOSI

1.1 Storia

Alla fine del diciannovesimo secolo Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg and Vianna identificarono indipendentemente il parassita che causa la leishmaniosi al quale Ronald Ross assegnò il nome generico di *Leishmania*. Nel 1904, Cathoire e Laveran trovarono *Leishmania* in bambini con anemia splenica infantile. Nicolle chiamò il parassita *L. infantum*, identificò il suo serbatoio nel cane a Tunisi nel 1908 e lo coltivò in laboratorio.

Carini identificò *Leishmania* in lesioni mucosali di pazienti affetti da leishmaniosi in Brasile nel 1912. Nel 1914, i Russi Yakimoff and Shakor distinsero i parassiti che causavano le forme urbana secca e rurale umida di leishmaniosi cutanea in Asia centrale. Nel 1922 Bramachari descrisse la leishmaniosi cutanea post-kala-azar (PKDL) in India. Nei primi anni 40, Swaminath, Shortt ed Anderson in India e Adler e Ber in Palestina dimostrarono la trasmissione di *L. donovani* ed *L. tropica* (probabilmente *L. major*) attraverso i flebotomi. Gradualmente, gli aspetti clinici e geografici della malattia umana sono stati implementati con studi sugli animali serbatoio, i vettori, il comportamento di *Leishmania* negli animali da laboratorio e l'ecologia del ciclo naturale della leishmaniosi gettando le basi per la classificazione e la comprensione della trasmissione della malattia. Per l'identificazione biochimica e molecolare si dovrà attendere l'introduzione dell'analisi degli isoenzimi negli anni 70 e l'ibridazione del DNA nei primi anni 80 (WHO, 2010).

1.2 Classificazione: cenni storici

Varie sono state le classificazioni proposte per il genere *Leishmania*. Tra il 1916 ed 1987 le classificazioni erano di tipo linneano monotetico ovvero basate sulla differenza di un unico carattere con pochi caratteri gerarchici. Questi sistemi di classificazione si sono in seguito evoluti in una classificazione che divideva genere *Leishmania* in due Subgeneri: *Leishmania* presente in Nuovo e Vecchio Mondo e *Viannia* limitata al Nuovo Mondo sulla base della localizzazione nell'intestino del vettore (Lainson and Shaw,

1987). Dagli anni 80 sono state utilizzate classificazioni di tipo andersoniano basate sulla similarità di un certo numero di caratteri considerati, senza gerarchie. Le classificazioni erano inizialmente di tipo fenetico, basate cioè per lo più sulla somiglianza nella morfologia o in altri caratteri osservabili senza tener conto della filogenia o della relazione evolutiva (WHO, 2010). Negli anni 90 le specie di *Leishmania* di interesse medico sono state riunite dall' OMS in complex in base al quadro patologico provocato (leishmaniosi viscerale, cutanea, muco-cutanea). Le specie sono state suddivise in unità tassonomiche chiamate zimodemi (Rioux et al., 1990) mediante la Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE). Ogni zimodema è composto da ceppi che presentano la stessa mobilità elettroforetica di un certo numero di enzimi a seconda del sistema standardizzato di riferimento (WHO, 2010). Gli zimodemi vengono indicati con il prefisso MON (Sistema Montpellier) o LON (Sistema London) seguito da un numero arabo: MON 1, MON 24, etc. (Gramiccia M., 1997). Gli isoenzimi sono considerati differenti forme alleliche di un gene ed una variazione enzimatica in un certo locus può essere interpretata come una mutazione avvenuta durante l'evoluzione. Attualmente la MLEE costituisce il gold standard per l' identificazione e la classificazione dei ceppi isolati di *Leishmania*. Il principale aspetto critico della metodica è costituito dal fatto che i genotipi vengono stabiliti indirettamente è quindi possibile che alcune sostituzioni nucleotidiche siano silenti ovvero non determinino cambiamenti amminoacidici negli enzimi codificati come è possibile che possano avvenire delle modificazioni post-traslazionali che determinano una diversa mobilità elettroforetica a parità di genotipo. Inoltre non sempre una sostituzione amminoacidica determina una modificazione della mobilità elettroforetica. La metodica è laboriosa in quanto richiede l'isolamento del parassita e ha costi elevati (Ochsenreither et al., 2006). Mentre *L. donovani* e *tropica* presentano un elevato polimorfismo enzimatico e genetico *L. infantum* è una specie piuttosto uniforme e quasi tutti gli isolati appartengono allo zimodema MON 1 e MON 72 (Pratlong et al., 2004). Numerosi studi sono stati condotti per analizzare loci genetici idonei per la discriminazione delle specie di *leishmania* su base genomica. Il limite di questi studi è spesso la validazione su un limitato numero di ceppi di una particolare area geografica. I loci più frequentemente analizzati sono stati il miniesone (ME), lo spaziatore interno trascritto (ITS1) del DNA ribosomiale (rDNA), il gene 7SL RNA, ed il gene della heat shock protein 70 (hsp70)

(Marfurt et al., 2003a-b, El Tai et al., 2000, Nasereddin et al., 2008, Schonian G. et al., 2003, Talmi-Frank et al., 2010, Odivuor et al., 2011, Stevenson et al., 2010, Zelazny et al., 2005, Fraga et al., 2012, Garcia et al., 2004, Montalvo et al., 2012). Recentemente attraverso un ampio studio di Multilocus Sequence Typing (MLST) di quattro geni markers ed il sequenziamento delle loro sequenze concatenate è stata dimostrata la congruenza tra i raggruppamenti dei ceppi nei quattro singoli markers, nella MLST e nella MLEE. In particolare l' hsp70 ed il miniesone hanno dimostrato la maggior risoluzione nel differenziare le specie di interesse medico. La validazione su scala globale propone l'analisi delle sequenze geniche come metodo di scelta nella diagnosi clinica, negli studi filogenetici ed epidemiologici (Van der Auwera et al., 2014). Recentemente è stato proposto l'utilizzo della Multilocus Microsatellite typing (MLMT) per studi di discriminare al di sotto del livello di zimodema nell'ambito di studi di epidemiologia molecolare. Le sequenze microsatelliti chiamate anche simple sequence repeats (SSRs) o short tandem repeats (STRs) sono brevi sequenze nucleotidiche (1-6 bp) ripetute in tandem presenti nel genoma di tutti gli organismi eucarioti il cui tasso di mutazione supera di 5 o 6 ordini di grandezza quello del resto del DNA. La variabilità dei loci dei microsatelliti è dovuta per lo più alla variazione della lunghezza della ripetizione degli alleli. I risultati di queste analisi sono riproducibili e interscambiabili tra laboratori.. La selezione sembra non agire sui polimorfismi nella lunghezza dei microsatelliti e le varianti alleliche sono individuabili a causa della natura codominante di questi markers. Il limite maggiore di questa tecnica è che le ripetizioni dei polimorfismi non sono conservate tra le diverse specie di *Leishmania*, quindi devono essere disegnati markers specifici per ogni specie (Ochsenreither et al., 2006). Studi di genetica di popolazione condotti attraverso l' MLMT hanno rivelato una struttura di popolazione gerarchica nei compless *L. tropica*, *L. major* and the *L. donovani*. L' esistenza di ibridi e di flusso genico tra le popolazioni di *Leishmania* suggerisce che la ricombinazione sessuale sia più frequente di quanto immaginato (Schonian et al., 2011).

1.3 Specie di *Leishmania* di interesse medico

Al giorno d'oggi sono conosciute circa 30 specie di *Leishmania* 20 delle quali sono considerate patogene per l'uomo (Bañuls et al., 2007) (**Figura 1**)

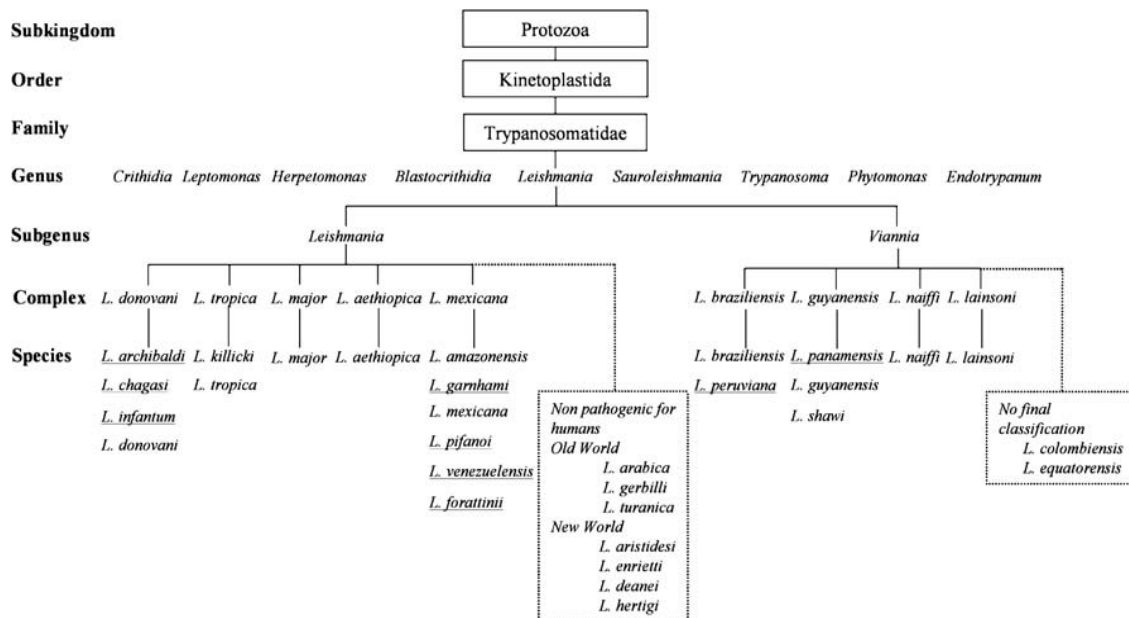


Figura 1. Tassonomia di *Leishmania* (da Bañuls et al., 2007)

1.4 Le leishmaniosi umane

Il Subgenere *Leishmania* comprende i complessi: *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*.

L. donovani complex: comprende gli agenti eziologici delle forme viscerotrope del Vecchio e del Nuovo Mondo come *L. donovani* responsabile in Asia del kala-azar (ciclo antroponotico), *L. archibaldi* che provoca il kala-azar in Africa orientale (ciclo zoonotico). *L. infantum* agente eziologico della leishmaniosi nel Bacino Mediterraneo, Senegal, Asia centrale e Nord della Cina, è l'unica specie autoctona presente in Italia e determina la leishmaniosi canina e la leishmaniosi viscerale e cutanea umana. *L. chagasi* è considerato sinonimo di *L. infantum* (Mauricio et al., 2000).

L. tropica complex: comprende *L. tropica* che causa forme cutanee del Vecchio Mondo è presente nel Bacino Mediterraneo, Medio Oriente, India, e in Africa occidentale che determina la forma secca del Bottone d'Oriente (ciclo antroponotico).

L. major complex comprende *L. major* diffusa nel Mediterraneo africano, Africa centro occidentale, Medio Oriente ed Asia centrale agente causale della forma umida del Bottone d'Oriente (ciclo zoonotico).

L. aethiopica complex causa la forma secca del Bottone d'Oriente ma con tendenza alla forma cutanea disseminata in Africa orientale (ciclo zoonotico).

L. mexicana complex comprende *L. mexicana* che determina nel Nuovo Mondo forme cutanee nell'uomo (ciclo zoonosico).

Il Subgenere *Viannia* comprende i complex: *L. brasiliensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*.

L. brasiliensis complex comprende *L. brasiliensis* agente causale di forme mucocutanee (espundia) nel Nuovo Mondo e *L. peruviana*, agente dell'Uta forma cutanea generalmente meno aggressiva diffusa in Perù (ciclo zoonotico).

L. guyanensis complex comprende *L. guyanensis* agente del Pian Bois Leishmaniosi cutanea verrucosa (ciclo zoonosico), *L. panamensis* (ciclo zoonosico).

L. naiffi complex comprende *L. naiffi* determina forme cutanee (ciclo zoonosico).

L. lainsoni comprende *L. lainsoni* determina forme cutanee (ciclo zoonosico).

1.5 Morfologia

Le leishmanie sono parassiti unicellulari, dixeni, con riproduzione di tipo clonale. Come gli altri membri dell'Ordine Kinetoplastida, sono caratterizzate dalla presenza di un grosso mitocondrio, nel quale si trova un accumulo di DNA extranucleare, detto kinetoplasto. Tale DNA è caratterizzato da una struttura particolare di maxi e minicircoli. Nel ciclo vitale della leishmania si distinguono due forme: una immobile, intracellulare (**amastigote**) ed una flagellata, extracellulare (**promastigote**); l'**amastigote** si localizza nelle cellule del sistema reticolo-istiocitario (SRI) degli ospiti vertebrati è ovoidale (Ø 2-5 µm) provvisto di citoplasma azzurofilo, nucleo rosso porpora e kinetoplasto violaceo alla colorazione di Giemsa (**Figura 1**). Il **promastigote**.

si localizza nel tubo digerente degli insetti vettori ed è caratterizzata da un kinetoplasto in posizione anteriore, in prossimità del quale emerge un flagello libero (**Figura 2**). Le forme infettanti per l'ospite mammifero (promastigoti metaciclici) sono presenti nella porzione anteriore dell'intestino e nella proboscide del flebotomo. Sono forme non in divisione caratterizzate da piccolo corpo cellulare e lunghissimo flagello ad elevata attività motoria.



Figura 1. Promastigoti di *Leishmania infantum* (40X)

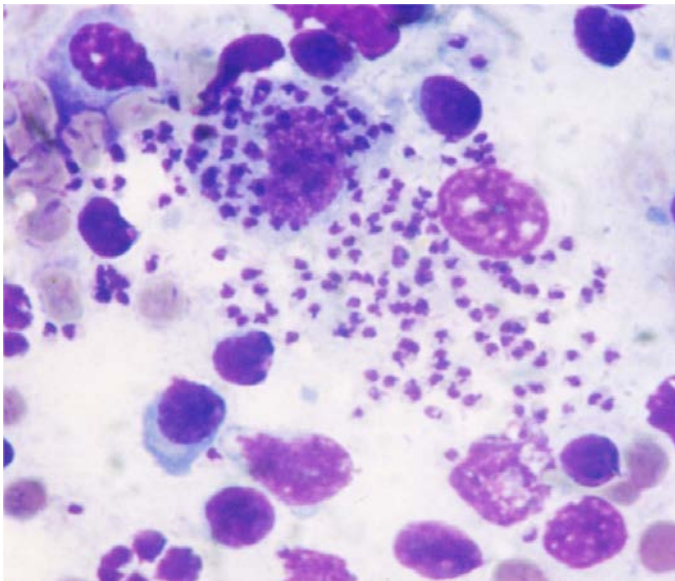


Figura 2. Amastigoti di *Leishmania infantum*

1.6 Ciclo biologico

Le leishmanie compiono il loro ciclo vitale tra due ospiti: un insetto dittero ematofago appartenente alla famiglia *Psychodidae* (generi *Phlebotomus* nel Vecchio Mondo, e *Lutzomya* nel Nuovo Mondo) che rappresenta il vettore e un mammifero, che svolge il ruolo di serbatoio dell'infezione (Molineux *et al.*, 1983). Il ciclo comincia quando un vettore infetto rigurgita nel derma dei mammiferi durante il pasto ematico, le leishmanie sotto forma di promastigoti metaciclici. Sembra che le forme infettanti vengano fagocitate inizialmente dai granulociti neutrofili (van Zandbergen *et al.*, 2004) e che solo in un secondo momento il complesso promastigote-neutrofili verrebbe fagocitato dai macrofagi. Nei macrofagi il parassita perde il flagello (amastigote) e dividendosi per scissione binaria porta alla rottura il macrofago che viene pertanto definito "cavallo di Troia". Gli amastigoti così liberati vanno ad infettare altri macrofagi ampliando l'infezione. Gli insetti vettori si infettano assumendo durante il pasto sangue gli amastigoti presenti nei monociti o nei macrofagi dei mammiferi infetti; nell'intestino medio dell'insetto, la cellula degenera e il parassita subisce almeno una divisione sotto forma di amastigote, prima di trasformarsi nel proventricolo dell'insetto in promastigote. Questa forma si divide attivamente per scissione binaria e va a colonizzare l'intestino dell'insetto; di qui l'infezione ascende verso la valvola esofagea, talvolta nel faringe dell'insetto. Il ciclo ricomincia quando, ad un nuovo pasto di sangue, i promastigoti infettanti metaciclici sono rigurgitati e depositati nel derma di un mammifero suscettibile (Sacks *et al.*, 1985; Saraiva *et al.*, 1986; Howard *et al.*, 1987).

2. II VETTORE

2.1 Caratteristiche generali e ciclo biologico

I flebotomi sono insetti di colore giallo pallido o sabbia (“phlebotomine sand flies”), hanno dimensioni molto piccole (2-4 mm). Si possono riconoscere dagli insetti delle loro stesse dimensioni dalla fitta peluria che li ricopre e perché a riposo tengono le ali a “V” sopra il corpo quando sono a riposo. Le zampe sono molto lunghe ed esili. I maschi sono riconoscibili dai segmenti genitali molto sviluppati e perché privi di apparato pungitore in quanto sono mellifagi (si nutrono di sostanze zuccherine naturali come la *melata*). Le femmine presentano invece un addome arrotondato e sono dotate di apparato pungitore essendo ematofaghe; un pasto di sangue è infatti necessario allo sviluppo delle uova. I flebotomi sono insetti ometaboli, il ciclo biologico si svolge con una metamorfosi completa dove la fase preimaginale presenta uno stadio embrionale di uovo, quattro stadi larvali e uno di pupa. I flebotomi sono insetti ad attività crepuscolare e notturna. Durante il giorno si rifugiano in luoghi relativamente freschi e umidi quali stalle, pollai, cantine, abitazioni, fessure di muri, di roccia e del suolo. Le femmine di flebotomo sono ematofaghe, anche se sono stati descritti fenomeni di autogenia (capacità di far maturare le uova senza pasto di sangue) in condizioni sfavorevoli. Dopo l'accoppiamento le uova vengono deposte in nicchie ecologiche, sulla base dei costituenti chimici e fisici del substrato e sulla presenza di feromoni delle uova già deposte, per garantire le condizioni ottimali allo sviluppo degli stadi preimaginali. L'areale geografico dei flebotomi si estende, a nord, fin sopra il 50° a sud fino al 40° parallelo. I flebotomi sono assenti solo in Nuova Zelanda e nelle isole del Pacifico (Romi et al., 2012) La loro distribuzione altitudinale va da sotto il livello del mare, nel Mar Morto, fino a 3300 m s.l.m. in Afghanistan (*P. rupester*) (Maroli et al., 2013). In Italia il limite massimo è stato registrato in Sicilia nelle Madonie 1200 e a Filetto (L'Aquila) 1070 m s.l.m.

Lo sviluppo delle larve terricole necessita di temperatura relativamente costante, oscurità, umidità relativa pressoché vicino alla saturazione e substrato nutritivo (foglie secche, spoglie di altri insetti, feci di roditori ecc.). In colonie da laboratorio è stata

notata una differenza tra le temperature ottimali di sviluppo di diversi flebotomi: 25-26 °C per *P. perniciosus*, 28-29°C per *P. perfiliewi* e 29-30° per *P.papatasi*. Il fotoperiodo ottimale è risultato quello del mese di Luglio (17 ore di luce, 7 ore di buio)(Maroli et al., 1983, 1987)

L'identificazione dei focolai larvali risulta difficile. Da osservazioni in natura e in studi su colonie di laboratorio risulta che la durata media del ciclo di sviluppo delle specie diffuse in Italia può variare da 45 giorni a due mesi. Durante la stagione calda (giugno-settembre) è stato osservato che possono verificarsi almeno due cicli di sviluppo completo corrispondenti quindi a due generazioni di adulti. Dal punto di vista comportamentale i flebotomi hanno un volo silenzioso e sono inoltre attratti da luci deboli. La distanza di volo è limitata a 100-200 metri, ma trasportati dal vento si possono spingere fino a 2 km. Sono disturbati dal vento e da temperature al di sotto della media estiva; È stato inoltre osservato che i flebotomi infetti da *Leishmania* compiono numerosi tentativi di puntura prima di riuscire a nutrirsi, forse per un danno provocato dal parassita alla valvola stomodeale, incrementando così l'efficienza di trasmissione. Inoltre, quando una femmina punge inietta saliva nella pelle dell'ospite. Questa, oltre a causare una reazione allergica in alcuni individui, può avere un ruolo fondamentale per il successo dell'infezione da parte di *Leishmania*, dato che ha un'azione immunosoppressiva sui macrofagi. Dagli studi effettuati per capire se i flebotomi abbiano o meno delle preferenze d'ospite è emerso che in condizioni naturali la scelta è dettata esclusivamente dalla reperibilità, abbondanza e dimensioni di un ospite a sangue caldo (Romi et al., 2012).

2.2 Identificazione di specie

L'identificazione dei flebotomi avviene sulla base della morfologia degli organi interni e necessita pertanto di processi di chiarificazione della chitina dell'esoscheletro. Nei maschi, la struttura principale da considerare è l'armatura genitale o ipopigio (IX e X segmento addominale modificati), costituito da appendici esterne: coxite e stilo, parameri e cerci. In particolare, la conformazione delle valve copulatrici rappresenta carattere distintivo per le singole specie (**Figura 3**). Per le femmine, sono da prendere in esame soprattutto le spermateche, costituite da un corpo principale suddiviso in segmenti, un processo della spermateca, i dotti e le dilatazioni presenti alla fine dei loro

dotti (**Figura 4**). La forma del corpo della spermateca, la presenza o meno di un collo tra il corpo e il processo, la lunghezza dei dotti e la presenza e numero dei segmenti sono distintivi per le singole specie. Un ruolo importante lo riveste anche l'armatura faringea costituita da dentelli chitinizzati che le femmine utilizzano per lacerare i globuli rossi al momento del pasto ematico; la loro forma e distribuzione sono caratteristici per ogni specie (Romi et al., 2012).

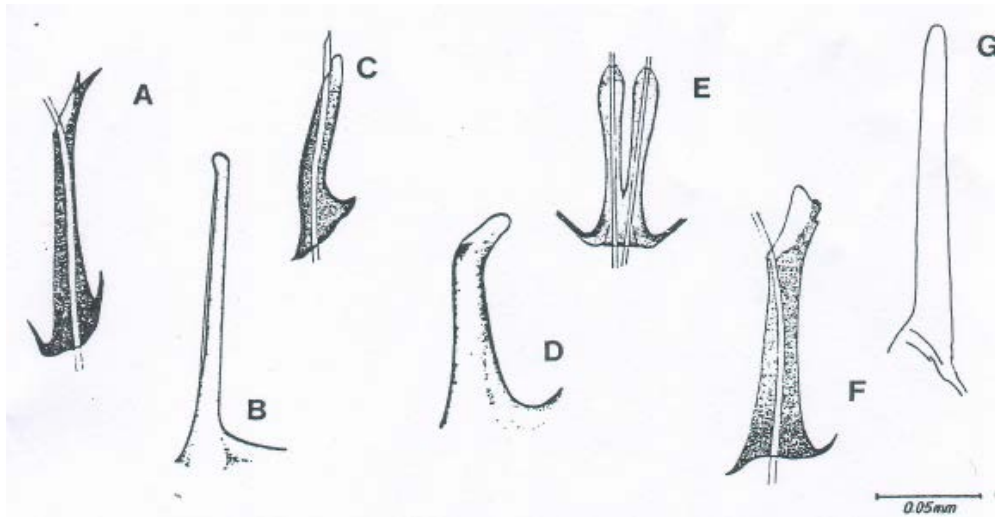


Figura 3. Valve copulatrici delle specie italiane: A) *P. perniciosus*; B) *P. major*; C) *S. minuta*; D) *P. papatasi*; E) *P. ariasi*; F) *P. perfliewi*; G) *P. mascittii*. (R. Romi et al., 1994)

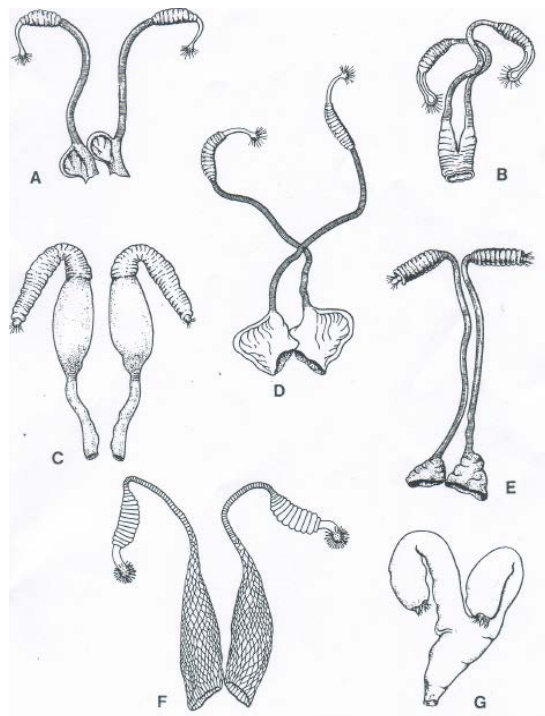


Figura 4. Struttura delle spermateche: A) *P. perniciosus*; B) *L. major*; C) *P. mascittii*; D) *P. perfliewi* E) *P. papatasi*; F) *P. ariasi*; G) *S. minuta*. (R. Romi et al., 1994)

2.3 Specie presenti in Italia

In Italia sono presenti sette specie appartenenti al genere *Phlebotomus*. *P. perniciosus*: *P. perfliewi* *P. neglectus* (= *P. major s.l.*) *P. ariasi* *P. papatasi* *P. sergenti* *P. mascittii* *P. perniciosus*, *P. perfliewi*, *P. neglectus* e *P. ariasi* sono state dimostrate infette da *L. infantum* in natura ma anche le altre specie sono potenzialmente in grado di trasmettere leishmania. Le specie più specie più abbondanti e diffuse nel nostro paese sono *P. perniciosus*, *P. perfliewi* e *S. minuta* (Maroli et al., 1994; Maroli & Houry, 1998)

P. perniciosus: è la specie più abbondante in Italia vettore provato di LV, LC, Lcan. La specie è presente nella maggior parte della nostre regioni, con densità elevate nelle aree della costa tirrenica e ionica, in Sicilia e Sardegna. E' presente in ambienti rurali ed urbani.

P. perfliewi: è il vettore principale della leishmaniosi cutanea, poiché la sua distribuzione coincide con quella della malattia. Comunque non può essere escluso un suo ruolo nella trasmissione della forma viscerale. Infatti questa specie è stata trovata infetta con *L. infantum* in un focolaio abruzzese di leishmaniosi cutanea e canina. Ha un'ampia diffusione, raggiungendo la più alta densità sul versante adriatico degli Appennini, dall'Emilia Romagna fino all'Abruzzo. Altri focolai di questa specie si ritrovano in Toscana, Calabria e Sicilia.

P. neglectus (= *P. major s.l.*): in passato era presente solo nelle regioni del Sud (Puglia, Calabria, Sicilia) dove agirebbe da vettore secondario di leishmaniosi viscerale. Attualmente ne sono stati identificati diversi focolai anche in Valle d'Aosta, Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli-Venezia Giulia e, limitatamente a un solo focolaio, in Abruzzo. È vettore provato di leishmaniosi viscerale in Grecia e Albania.

P. ariasi la sua distribuzione è limitata a pochi focolai in Liguria nelle province di Imperia e Savona, e in Piemonte nel Cuneese, dove è sospettato come possibile vettore secondario di leishmaniosi viscerale, essendo vettore provato in Portogallo, Spagna e Francia.

Le altre due specie di *Phlebotomus* sono vettori dimostrati di leishmaniosi non endemiche in Italia. *P. papatasi*: antropofilo ed ubiquitario anche se appare più abbondante nelle aree urbane è vettore di *Leishmania major*, agente di leishmaniosi cutanea zoonotica in un vastissimo territorio che si estende dal Marocco al Pakistan. I focolai di malattia sono costituiti da zone aride, semidesertiche e steppose. Potenzialmente, potrebbe trasmettere questa specie di *Leishmania* anche in Italia, ma l'introduzione di un ciclo endemico è ostacolata dalla mancanza del serbatoio naturale di questo parassita, costituito da roditori Gerbillidi, e dell'habitat specifico nel quale dovrebbe svilupparsi, ovvero le tane di questi roditori.

P. sergenti è presente solo in Sicilia. È vettore sinantropico di *Leishmania tropica*, agente di leishmaniosi cutanea (ciclo antroponotico) in un vasto territorio che va dal sud-est della Turchia al nord-ovest dell'India, e in piccoli focolai discontinui del nord Africa. Questa specie di flebotomo potrebbe costituire un potenziale rischio di introduzione di *L. tropica* in questa regione a partire da casi umani importati. *P. mascittii*, è rara in Italia e la sua distribuzione sembra essere limitata al Piemonte, Lombardia, Veneto, Toscana, Lazio, Abruzzo, Molise e Campania. Questa specie, anche se sospettata essere possibile vettore di *L. infantum* nel limite settentrionale della sua distribuzione (Austria, Germania), non è mai stata trovata infetta in natura (Romi et al., 2012). Il ruolo delle specie appartenenti al genere *Sergentomyia* nella trasmissione di *Leishmania* spp. deve ancora essere elucidato (Mukherjee et al., 1997; Senghor et al., 2011, Maroli et al., 2013).

3. LA LEISHMANIOSI CANINA

3.1 Definizione

La leishmaniosi canina (LCan) è una metazoonosi protozoaria ad eziologia complessa che nel cane, serbatoio epidemiologico, si identifica con una immunopatologia cronica ingravescente, parassitologicamente incurabile (da Poglayen, 2014).

3.2 Epidemiologia

La leishmaniosi è considerata oggi una malattia emergente o ri-emergente in molti paesi del bacino del Mediterraneo. Le mutate condizioni climatiche (global warming), le dinamiche socio-ecologiche (aumentata movimentazione di persone e animali) sono i fattori che hanno permesso la diffusione ed in alcuni casi la reintroduzione dei vettori e dei patogeni da essi trasmessi anche in aree in cui la malattia era assente (Otranto et al., 2009, Fisher et al., 2010, Maroli et al., 2013,). Dalla sua prima segnalazione in Italia nel 1910 agli anni 80 è rimasta confinata nel centro-sud Italia e nelle isole maggiori (Pozio et al., 1985). Dagli anni 90 ai giorni nostri il suo areale di distribuzione a cominciato a diffondersi a macchia di leopardo in zone del nord Italia sede di focolai autoctoni (Poglayen et al., 1997, Rossi et al., 1999; Ferroglio et al., 2002 Maroli et al., 2008, Baldelli et al. 2011).

Anche nel resto dell'Europa si sta assistendo ad un aumento dell'endemia in zone del bacino del Mediterraneo classicamente infette almeno in parte quali Spagna, Francia, (Martin-Sanchez et al., 2009, Dereure et al., 2009) e alla segnalazione di casi anche autoctoni di LCan e LV ed al reperimento di flebotomi in aree dell'Europa centrale storicamente non endemiche come Germania, Austria, Ungheria (Naucke et al., 2000; 2011, 2012, Bogdan et al., 2001; Farkas et al., 2011, Ready et al., 2010). Negli U.S.A. sono stati segnalati casi di LCan, probabilmente di importazione, in un allevamento di Foxhounds (Enserink, 2000, Gaskin et al., 2002, Schantz et al., 2005).

3.3 Patogenesi

La via principale di contagio è rappresentata dall'inoculazione di promastigoti metaciclici infettanti con la puntura del flebotomo. Il flebotomo inietta insieme ai promastigoti, sostanze vasodilatatrici, anticoagulanti ed immuno-modulatrici che facilitano l'instaurarsi dell'infezione (Ribeiro, 1995). I granulociti neutrofili, secondo quanto descritto nell'uomo per *L. major*, migrati nel sito d'infezione, i fagocitano il microrganismo senza ucciderlo, inoltre la loro apoptosi fisiologica risulterebbe ritardata fino a 2 giorni. I neutrofili infetti, tramite la produzione di una citochina, attraggono i macrofagi i quali a loro volta li fagocitano e quindi leishmania, internalizzata tramite questa via indiretta, riesce a sopravvivere ed a moltiplicarsi nei macrofagi che fungono da "cavallo di Troia". Infatti tramite i lipofosfoglicani (LPG) di superficie la leishmania inibisce la fusione del fagosoma con il lisosoma proteggendosi in tal modo dalla distruzione. La produzione di IFN-gamma, negli animali con risposta immunitaria cellulare prevalente, determina un aumento della produzione di NO da parte dei macrofagi che favorisce la maturazione del fagosoma e l'uccisione del parassita (Winberg et al., 2007). L'esito dell'infezione dipenderà dal tipo di risposta immune che innescata. In particolare, il controllo dell'infezione o l'evoluzione della malattia, sono legati alle popolazioni di linfociti T, CD4+. Nell'ambito della popolazione CD4+ si hanno due sottopopolazioni: i Th1 ed i Th2; i Th1, se attivati, determinano un'evoluzione benigna dell'infezione attraverso l'elaborazione di sostanze quali IFN-gamma, IL-2, TNF-alfa, IL-12 che promuovono l'uccisione del parassita. Al contrario la prevalente produzione di IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ed il fattore di stimolazione dei linfociti B (BSF-1) ad opera della sottopopolazione Th2 è responsabile della progressione dell'infezione verso la malattia.

3.4 Sintomatologia

Le manifestazioni cliniche della LCan possono essere le più varie in quanto determinate dalla deposizione di immunocomplessi circolanti. Si potrebbe dire che la maggioranza delle alterazioni cliniche e clinicopatologiche riscontrabili in generale

potrebbero essere compatibili, da sole o in associazione, con LCan. I segni clinici riscontrati con maggior frequenza sono in ordine decrescente: linfadenopatia generalizzata sistemica, lesioni cutanee, pallore delle mucose, perdita di peso, febbre, letargia, anoressia, splenomegalia, insufficienza renale, lesioni oculari, epistassi, artropatie, forme acute (febbre e linfadenopatia), insufficienza renale grave in assenza di altri sintomi (Noli, 1999).

3.5 Stadiazione

3.5.1 Stadiazione della LCan

Il Gruppo di Studio della Leishmaniosi Canina (GSLC) ha proposto una stadiazione della LCan suddividendo gli animali in 4 classi base allo stadio di infezione/malattia. (Paltrinieri et al., 2010).

STADIO A (ESPOSTO)

cane senza alterazioni cliniche e/o clinico-patologiche dimostrabili ed attribuibili a leishmaniosi. I test diagnostici diretti (citologia, istologia, colturale e prove biomolecolari) risultano negativi ma mostrano titoli anticorpali specifici < a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento.

Nel caso specifico il valore soglia del lab. IZSLT è di 1:80 (DGR 473/2010) della Regione Lazio. Generalmente i cani definiti esposti sono soggetti che vivono o hanno vissuto in area endemica per una o più stagioni di attività del vettore.

STADIO B (INFETTO)

cane senza alterazioni cliniche e/o clinico-patologiche dimostrabili ed attribuibili a leishmaniosi. I test diagnostici diretti (citologia, istologia, colturale e/o prove biomolecolari) risultano positivi con o senza titoli anticorpali specifici < di 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento.

STADIO C (MALATO)

cane infetto che presenta una qualunque alterazione clinica e/o clinico-patologica riferibile a leishmaniosi nel quale sia evidenziabile il parassita o titoli anticorpali specifici > di 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento.

STADIO D (MALATO CON QUADRO CLINICO GRAVE)

cane malato affetto da nefropatia proteinurica, insufficienza renale cronica, gravi malattie oculari che possano comportare la perdita funzionale e/o richiedano terapie immunosoppressive, gravi malattie articolari che possano invalidare la funzione motoria e/o richiedano terapie immunosoppressive, gravi malattie concomitanti (infettive, parassitarie, neoplastiche, endocrine o dismetaboliche).

STADIO E (REFRATTARIO o RECIDIVO)

cane malato refrattario al trattamento o se sottoposto a trattamento mostra recidiva precoce.

Un'altra classificazione presente è quella proposta da Solano-Gallego nel 2009 (**Tabella 1**) che, con un approccio più clinico, suddivide i malati in 4 stadi di gravità della malattia anche in base alla stadiazione della malattia renale cronica (CKD) della International Renal Interest Society (IRIS).

Tabella 1. Stadiazione della LCan in base alla sierologia, i segni clinici, i rilievi di laboratorio. Per ogni stadio sono indicate terapia e prognosi (da Solano-Gallego et al., 2011)

Clinical stages	Serology *	Clinical signs	Laboratory findings	Therapy	Prognosis
Stage I Mild disease	Negative to low positive antibody levels	Dogs with mild clinical signs such as peripheral lymphadenomegaly, or papular dermatitis	Usually no clinicopathological abnormalities observed Normal renal profile: creatinine < 1.4 mg/dl; non-proteinuric: UPC < 0.5	Scientific neglect/allopurinol or meglumine antimoniate or miltefosine/allopurinol + meglumine antimoniate or allopurinol + miltefosine**	Good
Stage II Moderate disease	Low to high positive antibody levels	Dogs, which apart from the signs listed in stage I, may present: diffuse or symmetrical cutaneous lesions such as exfoliative dermatitis/onychogryphosis, ulcerations (planum nasale, footpads, bony prominences, mucocutaneous junctions), anorexia, weight loss, fever, and epistaxis	Clinicopathological abnormalities such as mild non-regenerative anemia, hyperglobulinemia, hypoalbuminemia, serum hyperviscosity syndrome Substages a) Normal renal profile: creatinine < 1.4 mg/dl; non-proteinuric: UPC < 0.5 b) Creatinine <1.4 mg/dl; UPC = 0.5-1	Allopurinol + meglumine antimoniate or allopurinol+ miltefosine	Good to guarded
Stage III Severe disease	Medium to high positive antibody levels	Dogs, which apart from the signs listed in stages I and II, may present signs originating from immune-complex lesions: vasculitis, arthritis, uveitis and glomerulonephritis.	Clinicopathological abnormalities listed in stage II Chronic kidney disease (CKD) IRIS stage I with UPC > 1 or stage II (creatinine 1.4-2 mg/dl) [79]	Allopurinol + meglumine antimoniate or allopurinol + miltefosine Follow IRIS guidelines for CKD [80]	Guarded to poor
Stage IV Very severe disease	Medium to high positive antibody levels	Dogs with clinical signs listed in stage III. Pulmonary thromboembolism, or nephrotic syndrome and end stage renal disease	Clinicopathological abnormalities listed in stage II CKD IRIS stage III (creatinine 2-5 mg/dl) and stage IV (creatinine > 5 mg/dl) [79] Nephrotic syndrome: marked proteinuria UPC > 5	Allopurinol (alone) Follow IRIS guidelines for CKD [80]	Poor

Le due classificazioni proposte possono comunque essere integrate tra di loro non essendo in alcun modo in contraddizione.

3.5.2 Stadiazione della Malattia Cronica Renale

La Malattia Cronica Renale viene stadiata secondo le linee guida proposte dall' International Renal Interest Society (IRIS) prendendo in considerazione i livelli di creatinina ematici, la proteinuria e la pressione arteriosa.

- **Creatinina ematica**

classe 1: CRE < 1,4 mg/dl non azotemico

classe 2: CRE 1,4-2 mg/dl lieve azotemia renale, segni clinici lievi o assenti

classe 3: CRE 2,1-5 mg/dl moderata azotemia renale, possibili segni clinici sistemici

classe 4: CRE > 5 mg/dl segni clinici sistemici, crisi uremica

- **Sottoclassificazione in base alla Proteinuria**

Deve essere valutato il rapporto PU/CU in pazienti che non presentino infiammazioni del tratto urinario, emorragie o disproteinemie.

PU/CU < 0,2 Non proteinurico (NP)

0,2-0,5 Proteinurico Border line (BP)

> 0,5 Proteinurico (P)

I PU/CU nei ranges NP e BP possono essere classificati come microalbuminuria tramite l'ERD® test anche se il significato della microalbuminuria non è stato ancora compreso.

I pazienti BP devono essere rivalutati entro 2 mesi e riclassificati.

Il PU/CU deve essere utilizzato come indicatore per monitorare le terapie volte a ridurre l'ipertensione glomerulare pressione di filtrazione e la proteinuria.

- **Sottoclassificazione in base alla Pressione Arteriosa (PA)**

La misurazione della PA deve essere ripetuta più volte, in giorni diversi o nello stesso giorno dopo almeno 2 ore di intervallo, dopo che il paziente si sia abituato alle condizioni di misurazione.

Ps < 150	Pd <95	0 rischio minimo
150-159	95-99	1 rischio lieve
160-179	100-119	2 rischio moderato
>= 180	>=120	3 rischio elevato
nd	nd	rischio non determinato (RND)

(Se presenti range pressori specifici di razza 1: <10 mmHg sopra il range; 2: 10-20 mmHg sopra il range; 3: 20-40 mmHg sopra il range; 4: >= 40 mmHg sopra il range.)

La determinazione della PA è collegata al rischio di danno negli organi bersaglio che può essere evidente (complications-c) o meno (no complications-nc) . Nel caso di rischio moderato la PA va rivalutata ogni 2 mesi mentre nel caso di rischio elevato deve essere valutata ogni 1-2 settimane (www.iris-kidney.com).

3.6 Prognosi

Per prognosi si intende la previsione del decorso e dell'esito della leishmaniosi che dipende dalla gravità della malattia (stadiazione), dal tipo di terapia effettuata, dalla risposta del soggetto coinvolto (resistenza o suscettibilità) e da altre patologie concomitanti. L'emissione di una prognosi in ambito di leishmaniosi non è semplice per la complessità e la numerosità delle variabili coinvolte e per la mancanza attualmente di studi accreditati che abbiano analizzato e caratterizzato i diversi fattori prognostici.

Attualmente il GSLC si avvale della definizione del soggetto studiato e della stadiazione della leishmaniosi per emettere una prognosi.

STADIO A: la prognosi in questi casi è generalmente favorevole, i bassi titoli anticorpali presenti possono essere transitori e il cane negativizzarsi (sieroreversione) nel giro di qualche mese.

STADIO B: la prognosi viene considerata favorevole/riservata, favorevole se non vi è progressione dell'infezione (rilievo citologico positivo senza rialzo anticorpale), riservata in quanto può esserci progressione dell'infezione verso la malattia evidenziata da un rialzo del titolo anticorpale specifico. La progressione o meno dell'infezione dipende da una serie di variabili individuali (risposta immunitaria specifica e fattori genetici) e/o esterne (patologie concomitanti, terapia effettuata e tempistica della diagnosi).

STADIO C - D - E: la prognosi è strettamente legata alla gravità delle alterazioni clinico-patologiche con particolare riguardo alle alterazioni renali, queste ultime da valutare secondo quanto indicato dalla International Renal Interest Society (IRIS). Un ritardo nella diagnosi, la non idoneità del protocollo terapeutico associate a un danno renale importante fanno propendere per una diagnosi infausta (Roura et al., 2013).

3.7 Diagnosi

La diagnosi della LCan può risultare spesso complessa per la varietà dei segni clinici e delle alterazioni di laboratorio. Di seguito viene mostrato un algoritmo di corretto approccio diagnostico suggerito nel 2011 da Solano-Gallego (**Grafico 1**).

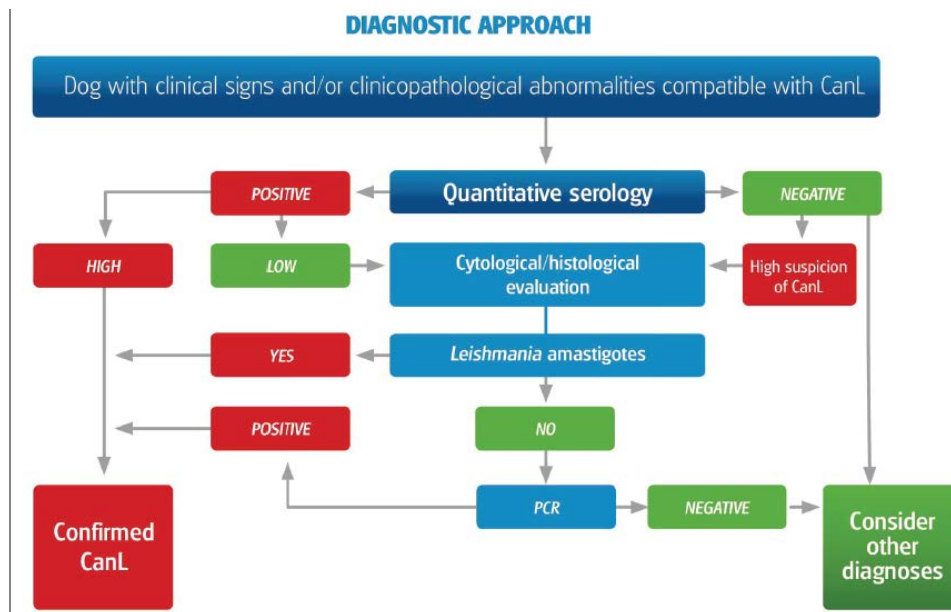


Grafico 1. Approccio diagnostico ai cani con alterazioni cliniche o clinico-patologiche compatibili con LCan (da Solano-Gallego et al., 2011)

3.8 Terapia

3.8.1 Considerazioni generali

La Lcan costituisce ancora una sfida per i clinici per la sua complessità immunopatogenetica, la varietà dei segni clinici e la gestione terapeutica. Le diverse molecole o associazioni di esse studiate negli anni, pur presentando attività leishmanicida in vitro, non consentono di ottenere la guarigione parassitologica in vivo. Per questa ed altre ragioni la malattia presenta caratteri di cronicità con alternanza di periodi di guarigione clinica e recidive. L'obiettivo perseguibile della terapia della Lcan è quindi la quanto più stabile remissione dei sintomi clinici e delle alterazioni clinicopatologiche, attraverso la riduzione della carica parassitaria, e la gestione delle recidive (Oliva et al., JAVMA 2010, 2011). La terapia e la sua opportunità sono inoltre relazionati alla stadiazione della leishmiosi (A esposto, B infetto, C malato, D gravemente malato, E refrattario/recidivo) come proposto dal GSLC (Paltrinieri et al., 2010). Inoltre gli animali malati possono presentare la malattia in un'ampia gamma di forme che vanno da lieve a molto grave in anche in relazione allo stato della

funzionalità renale valutato secondo le linee guida dell' IRIS (Solano-Gallego et al. 2009). La stadiazione della malattia renale e la sua terapia garantiscono un maggior successo terapeutico ed aspettativa di vita negli animali con leishmaniosi in forma avanzata. Un iter diagnostico accurato ed una classificazione del paziente attenta e dinamica costituiscono perciò le basi di una gestione terapeutica corretta oltrechè azioni sanitarie necessarie nella gestione di una malattia zoonosica.

3.8.2 Molecole

Le molecole utilizzate in questi anni per la terapia della Lcan sono:

Antimoniato di N-metilglucammina (meglumine)

MECCANISMO D'AZIONE: inibisce la glicolisi e l'ossidazione degli acidi grassi della leishmania.

Nel cane presenta una **breve emivita** (21' EV, 42' IM, 122' SC) dopo 6-9 ore dalla somministrazione l'80-95% della molecola è eliminato dal rene (Tassi et al., 1994).

POSOLOGIA: Il dosaggio più comunemente utilizzato è 100 mg/kg SC SID per 4-8 settimane, ma data la farmacocinetica della molecola è preferibile somministrare **50 mg/kg SC BID per 4-8 settimane** (Oliva et al., JAVMA 2010). Cicli ripetuti e modalità di somministrazione non appropriate di antimoniato di meglumine possono selezionare ceppi di *Leishmania* resistenti (Gramiccia et al. 1992).

EFFETTI COLLATERALI: possibili effetti collaterali sono cellulite e formazione di ascessi cutanei, nefrotossicità (Solano-Gallego et al. 2011). In uno studio gli antimoniali hanno determinato ingenti danni morfologici a livello tubulare, non accompagnati tuttavia da disturbi funzionali rilevabili nel periodo di osservazione (Bianciardi et al. 2009). Pertanto la nefrotossicità degli antimoniali rimane controversa. Sono stati riportati anche febbre, diarrea, perdita d'appetito (Oliva et al., JAVMA 2010).

Antimoniali in formulazione liposomiale: l'incapsulamento delle molecole, somministrate EV, ne aumenta emivita, volume di distribuzione nei tessuti infetti e riduce le recidive rispetto alla forma libera (Valladares et al. 2001) ma non è sufficiente comunque ad eliminare il parassita (Schettini et al. 2005). Secondo uno studio condotto (da Silva et al. 2012) gli **antimoniali in formulazione liposomiali + allopurinolo** produrrebbero invece la **guarigione parassitologica del 50% degli animali trattati**. Gli antimoniali in forma liposomiale non sono commercialmente disponibili.

Allopurinolo: analogo strutturale dell'ipoxantina (purina) che viene trasformata in acido urico dall'enzima xantina ossidasi. L'allopurinolo lega con maggior affinità l'enzima xantina ossidasi inibendone l'azione e riducendo la produzione di urati e la formazione di calcoli.

MECCANISMO D'AZIONE: entrato negli amastigoti di leishmania si trasforma in un prodotto tossico ed esplica azione parassitostatica. Usato in monoterapia porta ad un moderato miglioramento delle condizioni cliniche che tendono a peggiorare alla sospensione del farmaco.

POSOLOGIA: I dosaggi più comunemente utilizzati in medicina veterinaria vanno dai **5 ai 20 mg/kg PO ogni 12 ore per 4-24 mesi** (Oliva et al., JAVMA 2010).

EFFETTI COLLATERALI: può determinare la formazione di calcoli di xantina.

Antimoniato di meglumine + allopurinolo: costituisce il gold standard della terapia della Lcan, tuttavia molti studi condotti su questa associazione di molecole hanno avuto un breve follow up ed una variabilità clinica dei soggetti trattati. In un recente studio (Torres et al., 2012) a lungo termine (2-9 anni) su cani con leishmaniosi clinica in stadio II (Solano-Gallego 2009) con tale protocollo è stato osservato 1) rapido miglioramento clinico (30-90 gg), come già dimostrato da altri studi, accompagnato da normalizzazione del protidogramma 2) lunga sopravvivenza dei soggetti e buona qualità di vita 3) alcune recidive accompagnate da aumento dei titoli anticorpali e della parassitemia 4) comparsa di lesioni immunomediatae (vasculite cutanea, uveite, artrite) in animali con alti titoli anticorpali al momento della diagnosi e durante la terapia, non accompagnate da aumento della parassitemia 5) comparsa di urolitiasi, riferibile alla somministrazione di allopurinolo, che ha portato ad idronefrosi e nefrectomia di alcuni casi 6) nessuna tossicità renale anche dopo cicli ripetuti di antimoniato di meglumine. Gli autori hanno concluso l'importanza del **monitoraggio della terapia con allopurinolo** attraverso analisi delle urine ed il **controllo terapeutico delle lesioni immunomediatae** per il mantenimento di una buona qualità di vita degli animali malati. In uno studio che comparava gli effetti dell'antimoniato di meglumine e dell'allopurinolo in monoterapia od in associazione quest'ultima è risultata più efficace nel ridurre le recidive e nel riportare i rilievi clinicopatologici nella norma (Paradies et al., 2012).

Miltefosina: chemioterapico

MECCANISMO D'AZIONE: esplica la sua azione inibendo le vie di comunicazione cellulare e la sintesi della membrana cellulare parassitaria. La miltefosina stimola inoltre i linfociti T ed i macrofagi a produrre reattivi intermedi dell'ossigeno e del nitrogeno (radicali liberi) ad azione microbiocida.

Usata in monoterapia presenta efficacia clinica nel 90% degli animali trattati, riduzione dei titoli anticorpali e della carica parassitaria. In alcuni casi sono comparse recidive tra 9°-12° mese con concomitante aumento della carica parassitaria rilevata con RT-PCR (Manna et al. 2008b).

POSOLOGIA: la posologia raccomandata è di **2 mg/kg PO SID per 28 gg.**

EFFETTI COLLATERALI: gli effetti collaterali più comunemente osservati

Miltefosina + allopurinolo: L'associazione al dosaggio di **2 mg/kg miltefosina PO SID per 28 gg 10 mg/kg allopurinolo PO BID per 12 mesi** produce un miglioramento clinico nell'arco di 3 mesi con aumento dei livelli di IFN γ . Negli ultimi mesi del follow up (12 mesi) è stato osservato un aumento della carica parassitaria, una diminuzione di IFN γ e IL4 non accompagnati da un cambiamento delle condizioni cliniche (Manna et al., 2008a). Gli stessi autori hanno effettuato su alcuni cani, in un successivo studio, un secondo ciclo di miltefosina a distanza di 6 mesi dal primo, indipendentemente dalle condizioni cliniche degli animali, che non ha tuttavia condotto alla guarigione parassitologica. Gli autori hanno quindi concluso che **l'utilizzo indiscriminato di un secondo ciclo di miltefosina è da sconsigliare** (Manna et al., 2009).

Domperidone:

MECCANISMO D'AZIONE: antagonista dei recettori D2 della dopamina stimola l'immunità cellulo-mediata.

Il domperidone è efficace nel migliorare i segni clinici e ridurre i titoli anticorpali di animali naturalmente infetti in stadi precoci della malattia. È stato anche rilevato un miglioramento dell'immunità cellulo-mediata attraverso il test cutaneo della leishmanina e il test di proliferazione linfocitaria (Gómez-Ochoa et al., 2009). Questi risultati possono inoltre indicare, anche se non specificamente provato, che il domperidone aiuta gli animali già infetti a controllare la progressione della malattia da condizioni di sub-patenza (Gómez-Ochoa et al., 2012).

In uno studio condotto su animali sani il domperidone ha stimolato significativamente l'attivazione dei neutrofili negli animali trattati rispetto ai non trattati. L'attivazione dei neutrofili è durata per un mese dalla sospensione della molecola (Gómez-Ochoa et al., 2012).

In uno studio condotto in area endemica su animali sani si è dimostrato efficace nel ridurre il rischio di leishmaniosi in forma clinica di 7 volte nei cani trattati rispetto ai non trattati (Sabatè et al. 2014).

POSOLOGIA: 0,5 mg/kg PO SID per 30 gg. Ripetere il ciclo ogni 4 mesi (Febb-Ott-Giu).

EFFETTI COLLATERALI: il domperidone risulta ben accettato dagli animali e gli effetti collaterali sono molto rari e di lieve intensità.

Altre numerose molecole quali: Marbofloxacin (Rougier et al., 2008, 2012) Metronidazolo, Spiramicina-Metronidazolo, Pentamidina sono state testate con risultati in generale scarsi e tra loro spesso discordanti.

3.9 Linee guida del Gruppo di Studio della Leishmaniosi Canina (GSLC)

Secondo il GSLC (Oliva et al., 2011) non ci sono differenze di efficacia tra la terapia combinata Antimoniato di N-metilglucammina/allopurinolo e miltefosina/allopurinolo. Tuttavia in virtù del maggior numero di studi condotti a lungo termine sull'associazione Antimoniato di N-metilglucammina/allopurinolo questa costituisce la prima scelta terapeutica per tutti i soggetti malati (stadio C GSLC; malattia lieve e moderata secondo Solano-Gallego et al. 2009) e gravemente malati (stadio D GSLC; malattia grave secondo Solano-Gallego 2009) con la seguente posologia:

- ♣ Antimoniato di N-metilglucammina 50 mg/kg SC BID per 4-8 settimane
- ♣ Allopurinolo 10 mg/kg PO BID per 4-24 mesi.

Se è presente interessamento renale trattare secondo linee guida IRIS. E' importante sottolineare che la proteinuria deve essere valutata dopo 4-8 settimane di terapia, in quanto la terapia diminuisce significativamente la proteinuria (Pierantozzi et al., 2013).

Gli animali che presentano malattia in forma molto grave (IRIS classe III e IV) dovrebbero essere trattati solo con allopurinolo (Solano-Gallego 2009).

3.10 Monitoraggio

Il monitoraggio della leishmaniosi canina presenta scopi e modalità e tempi di esecuzione diversi a seconda dello stadio in cui si trova l'animale:

Stadio A-Esposto

1) Individuare l'eventuale progressione da esposizione ad infezione.

Visita clinica e titoli anticorpali ogni 2-4 mesi dalla prima sieropositività riscontrata. Eventuali ulteriori analisi per escludere la presenza del parassita negli animali esposti.

Stadio B-Infetto

1) Individuare l'eventuale progressione da infezione a malattia.

Visita clinica/emocromo/biochimico/elettroforesi/esame delle urine PU/CU/titoli anticorpali ogni 2-4 mesi per 1 anno. In assenza di sieroconversione rivalutare ogni 6-12 mesi.

Stadio C-Malato

1) Valutare la risposta alla terapia.

Visita clinica/emocromo/biochimico/elettroforesi/esame delle urine PU/CU dopo 4-6 sett. di trattamento poi ripetere dopo 2-4 mesi per 1 anno. A 4-6 mesi dall'inizio della terapia rivalutare i titoli anticorpali. Rivalutare ogni 6-12 mesi a vita (Roura et al. 2013). Nel caso di utilizzo del protocollo terapeutico standard (antimoniato di meglumine per 4-8 settimane + allopurinolo per 12-24 mesi) l'efficacia e quindi la durata della terapia con antimoniato devono essere valutate attraverso la determinazione delle proteine plasmatiche, in particolare le globuline, che devono normalizzarsi. I titoli anticorpali risultano un parametro non affidabile per la valutazione dell'efficacia terapeutica in quanto il loro decremento è spesso lento ed incostante, ma possono essere utilizzati per individuare le recidive (Torres et. al 2011).

La durata della terapia con allopurinolo dipende dalla gravità della malattia, dalla risposta del soggetto e dalla tolleranza dello stesso al farmaco.

La sospensione della molecola può essere effettuata dopo 12 mesi se:

- ♣ Sono avvenute normalizzazione clinica/clinicopatologica (emocromo, biochimico, elettroforesi/analisi delle urine PU/CU);
- ♣ i livelli anticorpali, determinati con metodica quantitativa, risultino normali o border line.

La sospensione deve essere effettuata anche se non è possibile controllare la xantinuria diminuendo il contenuto di purine nella dieta o riducendo il dosaggio del farmaco (Solano-Gallego et al. 2011).

2) *valutare l'infettività residua degli animali trattati.*

qPCR (Roura et al. 2013). La correlazione tra carica parassitaria e risposta alla terapia richiede ulteriori studi (Solano-Gallego et al. 2011).

Stadio D-Gravemente Malato

1) *Valutare la risposta alla terapia.*

Visita clinica/emocromo/biochimico/elettroforesi/esame delle urine PU/CU. All'inizio della terapia valutare ogni 7-10 gg poi ogni 1-2 mesi.

2) *valutare l'infettività residua degli animali trattati.*

qPCR (Roura et al. 2013). La correlazione tra carica parassitaria e risposta alla terapia richiede ulteriori studi (Solano-Gallego et al. 2011).

Stadio E-Refrattario/Recidivo

1) *Valutare la risposta alla terapia.*

Visita clinica/emocromo/biochimico/elettroforesi/esame delle urine PU/CU. All'inizio della terapia valutare ogni 7-10 gg poi ogni 1-2 mesi.

2) *valutare l'infettività residua degli animali trattati.*

qPCR (Roura et al. 2013). La correlazione tra carica parassitaria e risposta alla terapia richiede ulteriori studi (Solano-Gallego et al. 2011).

3.11 Profilassi

La profilassi per la leishmaniosi canina si basa essenzialmente su misure volte ad evitare il contagio dell'ospite vertebrato con il flebotomo in quanto l'azione su i focolai larvali risulta poco praticabile. Le misure possono essere di tipo meccanico ovvero

l'utilizzo di zanzariere e anche l'evitare di far il cane dormire all'aperto o di tipo chimico. I prodotti di tipo chimico, presenti in commercio in numerose formulazioni (spray, collari, spot on) sono generalmente a base di piretroidi da soli o in associazione ed esplicano un effetto antifeeding e insetticida. I presidi chimici devono essere utilizzati nella stagione di attività dei vettori che alle nostre latitudini va da Maggio ad Ottobre circa (Maroli et al, 2009).

4. L'ANALISI GEOSPAZIALE

Sistema Informativo Territoriale (SIT) e Geographic information system (GIS)

I termini SIT e GIS vengono spesso confusi o utilizzati come sinonimi. Il SIT è un insieme organizzato di informazioni attinenti il territorio che utilizzate in sinergia permettono la costruzione di informazioni derivate utili per la pianificazione, gestione, e valutazione di interventi. Tale sistema si compone di strumenti cartografici, informatici, GIS e di risorse umane. Il GIS è il sistema Hardware e Software che supporta l'operatore nella raccolta, organizzazione e analisi del patrimonio informativo. Permette l'elaborazione, manipolazione e rappresentazione di dati geometrici georeferenziati ovvero corredati di coordinate geografiche. Nel GIS è possibile rappresentare i dati secondo due modelli: vettoriale e *raster* (o *grid*). Il modello vettoriale, mutuato dalla cartografia, è costituito da un sistema di punti, linee e poligoni. Risulta indicato per la rappresentazione di entità con una precisa localizzazione o delimitazione (variabili discrete) (Es. città, confini comunali, casi di malattia, etc.). Il modello *raster*, derivato dalle immagini satellitari, è formato da una griglia regolare di celle, ciascuna cella è chiamata *pixel* (Picture Element). Questo modello è particolarmente adeguato per rappresentare entità senza una chiara delimitazione (variabili continue) (Es. uso del suolo, dati climatici, etc.). La precisione o risoluzione del modello dipendono dalle dimensioni dei pixel. Una possibilità offerta dal GIS è quella di sovrapporre diversi livelli informativi (strati o *layers*), sulla base del loro comune riferimento geografico, e metterli in relazione per ottenere nuove informazioni.

http://www.di.unipi.it/~mogorov/Dispensa_Cartografia_Trevisani.pdf

http://it.wikipedia.org/wiki/Sistema_informativo_territoriale

I GIS presentano normalmente delle funzionalità di analisi spaziale ovvero di trasformazione ed elaborazione degli elementi geografici degli attributi. Esempi di queste elaborazioni sono:

- l'overlay topologico: in cui si effettua una sovrapposizione tra gli elementi dei due temi per creare un nuovo tematismo;

- le query spaziali, ovvero delle interrogazioni di basi di dati a partire da criteri spaziali (vicinanza, inclusione, sovrapposizione etc.);
- il buffering: da un tema puntuale, definire un poligono di rispetto ad una distanza fissa o variabile in funzione degli attributi dell'elemento;
- la segmentazione: algoritmi di solito applicati su temi lineari per determinare un punto ad una determinata lunghezza dall'inizio del tema;
- la network analysis: algoritmi che da una rete di elementi lineari (es. rete stradale) determinano i percorsi minimi tra due punti;
- la spatial analysis: algoritmi che utilizzando modelli dati raster effettuano analisi spaziali di varia tipologia, ad es: analisi di visibilità;
- analisi geostatistiche: algoritmi di analisi della correlazione spaziale di variabili georeferite.

http://it.wikipedia.org/wiki/Sistema_informativo_territoriale

PARTE SPERIMENTALE

1. MATERIALI E METODI

1.1 Area di Studio

La provincia di Rieti si trova a nord-est della regione Lazio, confina a ovest, lungo il Tevere, con la provincia di Viterbo e la provincia di Roma; a nord con l'Umbria (provincia di Perugia e provincia di Terni); a est con Marche (provincia di Ascoli Piceno), e Abruzzo (provincia dell'Aquila e provincia di Teramo). Il territorio è prevalentemente montuoso con i Monti della Duchessa e i monti del Cicolano a sud (gruppo del Monte Nuria e di Monte Giano), il Monte Terminillo (2217 m s.l.m.) e i Monti Reatini a nord, i Monti della Laga (2458 m s.l.m.) ad est al confine con l'Abruzzo. La provincia è ricca dal punto di vista idrografico essendo attraversata da numerosi corsi d'acqua quali Tevere, Velino, Salto, Turano, Peschiera, Farfa, Aia (Imella). Di notevole importanza sono i due laghi artificiali: lago del Salto e lago del Turano, entrambi nati nel ventennio fascista, situati rispettivamente nella Valle del Salto appartenente alla zona del Cicolano e in alta Sabina. Nel territorio provinciale vi sono numerose aree protette. A sud si trova il Parco regionale naturale dei Monti Lucretili, a sudest la Riserva regionale Montagne della Duchessa e una piccola parte del Parco regionale naturale del Sirente-Velino. Tra le due aree sorge la Riserva naturale Monte Navegna e Monte Cervia (tra il lago del Salto e il lago del Turano). A sud-est A nord-est il gruppo dei Monti della Laga (nel Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga). Nella Piana Reatina si trova la Riserva parziale naturale dei Laghi Lungo e Ripasottile, a ovest parte della Riserva naturale di Nazzano, Tevere-Farfa. La provincia di Rieti è popolata da 160.467 abitanti, con una densità di 58,34 ab./km², ed ha come capoluogo Rieti. Si estende su una superficie di 2.749,16 km² e comprende 73 comuni (http://it.wikipedia.org/wiki/Provincia_di_Rieti). Il clima della provincia di Rieti in base ai valori di temperatura e precipitazioni medie annue (11, 3° C e 558, 0 mm) a causa della sua collocazione interna e del suo territorio montuoso -pari al 70% del territorio- può essere classificato *freddo-secco* (**Figura 1**).

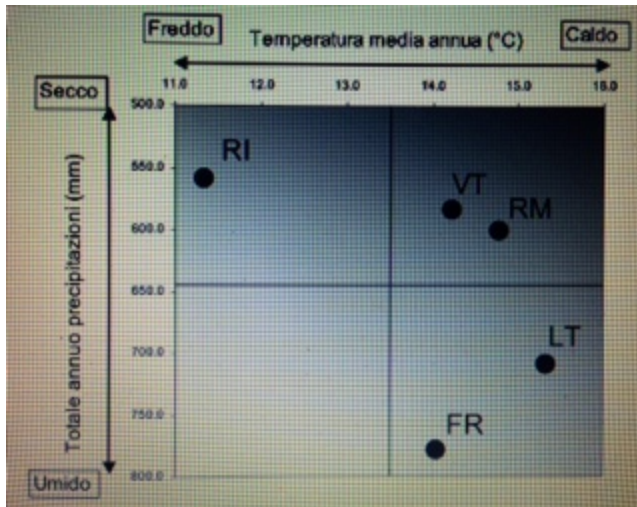


Figura 1. Classificazione dei climi delle Province della regione Lazio in base alla temperatura media annua e al totale medio annuo delle precipitazioni piovose.

Il clima differisce dalle condizioni climatiche delle altre province laziali a causa della sua distanza dal mare e della sua orografia. Le temperature minime nei mesi di Dicembre, Gennaio e Febbraio sono in assoluto le più basse (rispettivamente $0,9^{\circ}\text{C}$, $-0,5^{\circ}\text{C}$ e $0,1^{\circ}\text{C}$) fra quelle osservate nella Regione e le massime estive non risultano molto elevate (T_{max} di Agosto $26,3^{\circ}\text{C}$). La pluviometria denota un totale annuo inferiore ai 600 mm. Si riportano di seguito i valori medi climatici nel periodo 1951-2005 (**Figura 2**).

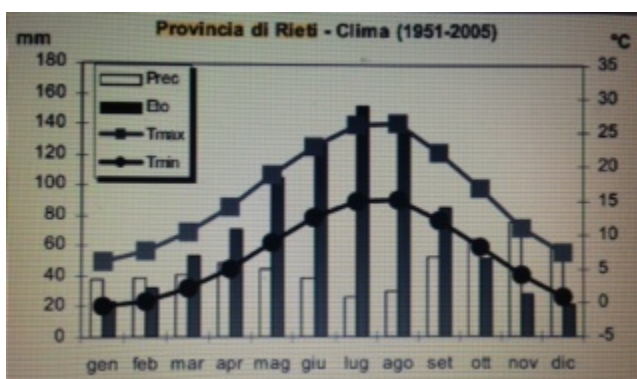


Figura 2. Valori medi climatici mensili periodo (1951-2005).

Lo stato di conservazione della vegetazione forestale non è buono: le pratiche di sfruttamento perpetuate per decenni (ceduazioni) ed i rimboschimenti, massicciamente

effettuati fino agli anni '60 del secolo scorso, hanno generalmente alterato ed impoverito le superfici boschive che presentano carattere diffusamente monospecifico e coetaneo. La vegetazione naturale ha una distribuzione irregolare nel territorio provinciale. Le formazioni appenniniche mantengono ancora una certa continuità, mentre il resto del territorio è caratterizzato dalla presenza di isole di vegetazione naturale comprese tra vaste estensioni di aree intensamente sfruttate dalle attività antropiche (**Figura 3**).

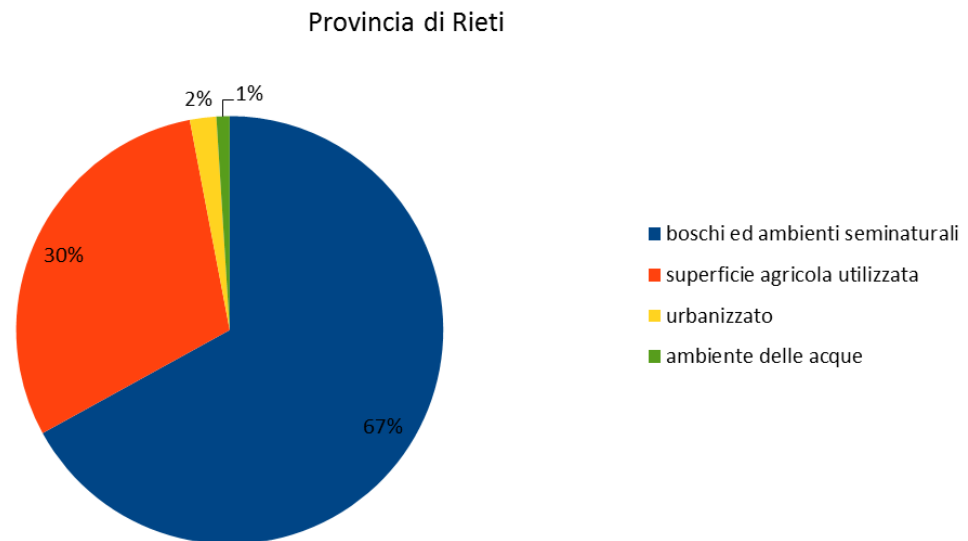


Figura 3. Uso del suolo (DAFNE, 2012).

La superficie agricola del territorio provinciale è suddivisa in un numero relativamente elevato di aziende questa struttura è stata largamente perduta nei comprensori di pianura, e talvolta anche in quelli collinari, specialmente nelle zone più favorevoli all'intensificazione delle produzioni agricole. La zootecnia è caratterizzata da allevamenti di bovini, ovini, equini, che in alcune aree vengono allevati allo stato semi-brado, e suini. L'ovinicoltura ancora rappresenta un comparto produttivo di rilevante importanza con densità di capi certamente superiori a quelle di altre Province italiane (DAFNE, 2012). Dal punto di vista sanitario la provincia è suddivisa in 5 Distretti (**Figura 4**).

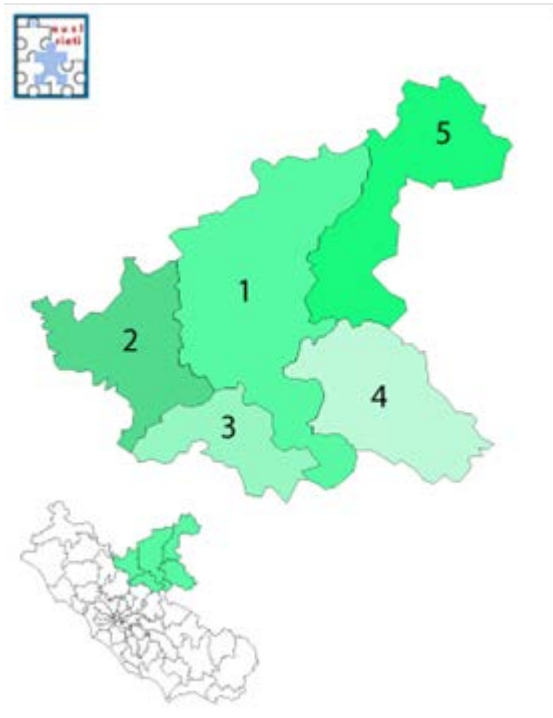


Figura 4. Distretti Sanitari della provincia di Rieti: 1) Montepiano Reatino 2) Mirtense, 3) Salario-Turano, 4) Salto-Cicolano, 5) Alto-Velino.

1.2 Elaborazioni Geospaziali e Statistiche

L'utilizzo dell'ambiente GIS ha riguardato le diverse fasi del presente lavoro: dalla rappresentazione di dati puntiformi (Aziende zootecniche, stazioni climatiche, casi di LV LC etc) alla elaborazione di cartografie varie quali la selezione di aziende zootecniche in base al livello altitudinale, la valutazione delle distribuzioni di densità sul territorio (Kernel Density su cani positivi e popolazione canina) la creazione di coropete relative alla sieroprevalenza grezza. Le coropete sono cartografie in cui la variabile rappresentata si basa su unità amministrative. La Kernel Density è invece una tecnica di interpolazione. Essa calcola un valore di densità in un intorno circolare di punti, attribuendolo poi ad una cella raster. Si tratta quindi di una media mobile spazialmente pesata che genera una superficie fatta di celle contenenti i valori calcolati.

Il valore di densità attribuita ad ogni cella del raster in output è calcolato sommando i valori di tutte le superfici Kernel che si sovrappongono al centro di ogni cella.

L'acquisizione dei dati dalle rispettive fonti è stata seguita da operazioni di sintesi (es. medie, ecc.) e integrazioni sui dati stessi, volte alla costituzione dei dataset su cui effettuare le rappresentazioni o elaborazioni di tipo GIS e statistico. In particolare, riguardo ai dataset sierologici della provincia di Rieti (periodo 2006-2013). Le elaborazioni geospaziali dei dati acquisiti sono state effettuate con ArcGis 9.3.

L'analisi statistica condotta è stata inizialmente di tipo descrittivo (densità vettori, variabili ambientali...) e successivamente inferenziale (attraverso test non parametrici). Medie, mediane, frequenze assolute e percentuali (%) sono state utilizzate per l'analisi descrittiva. Le associazioni tra variabili inerenti i serbatoi ed i vettori di leishmaniosi (sesso, età, razza, stato di positività, metodo di cattura, specie) sono state valutate con il test chi quadrato o con il test esatto di Fisher, mentre le correlazioni tra variabili ambientali (temperatura media nei giorni di cattura, tasso di umidità e precipitazioni) e il numero di flebotomi sono state valutate con il coefficiente di Spearman (r). Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per confrontare le mediane delle variabili non distribuite normalmente (età). Un valore $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le elaborazioni sono state effettuate con Stata versione 12,0 (StataCorp LP, Texas, USA).

1.3 Fonti dati

1.3.1 Sistema Informativo Laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (SIL-IZSLT)

Tale sistema è al centro delle varie attività dell'Istituto: accettazione centralizzata dei campioni, inserimento dei risultati, refertazione, estrazione dei dati per i report, analisi, flussi e dati in ottemperanza a debiti informativi verso altri enti, ma anche controlli di tipo gestionale e amministrativo. Dal SIL sono stati estratti i risultati delle prove di laboratorio relativi alla leishmaniosi canina. SIL-IZSLT (Sistema Informativo Laboratori).

Fornisce gli esiti dei controlli effettuati presso i laboratori IZSLT ed altre informazioni ad essi relativi. Per il presente studio si è fatto uso delle prove sierologiche IFI (Immuno Fluorescenza Indiretta) effettuate per Leishmaniosi canina nel periodo 2006-2013.

1.3.2 Anagrafe canina informatizzata della regione Lazio (ACIRL)

L'ACIRL costituisce il sistema informativo per la gestione dell'Anagrafe Animale (Cani, Gatti e Furetti) della Regione Lazio, garantendo il trasferimento alla Banca dati Nazionale di tutti gli animali iscritti. L'iscrizione all'anagrafe è a tutt'oggi obbligatoria solo per i cani. L'anagrafe canina è stata istituita nel 2005 e si è strutturata nel tempo prevedendo un sempre maggior coinvolgimento dei veterinari libero professionisti nella gestione dei dati sanitari della popolazione canina (stampa dell'iscrizione, inserimento del decesso e dei dati delle malattie infettive). In particolare con la DGR 473/2010 "Approvazione delle procedure sanitarie e misure da adottare nei casi sospetti e/o confermati di Leishmaniosi canina nella Regione Lazio" ci si è proposti di creare un archivio aggiornato e completo dei casi confermati e sospetti di LCan, malattia zoonosica, rilevante in sanità pubblica. Il provvedimento mira alla sorveglianza e controllo di questa malattia nei cani e rende consapevoli i proprietari sulle misure da prendere in caso di infezione. Lo spirito della DGR 473/2010 è quello di agevolare la comunicazione dei casi, fornendo uno strumento informatico per la segnalazione (come parte del portale dell'ACIRL) ai veterinari liberi professionisti o laboratori privati ed assicurando all'Osservatorio Epidemiologico Regionale dati aggiornati e prontamente fruibili. Tale strumento si rivela un importante nodo di raccordo tra sanità pubblica e privata. Al fine di limitare la diffusione della malattia, la segnalazione dei casi confermati di LCan è accompagnata dalla compilazione di un questionario sulla esposizione dei cani a possibili fattori di rischio e seguita dalla consegna al proprietario di un modello con gli adempimenti cautelativi da effettuare (obbligo di terapia, utilizzo di presidi antivettoriali, etc..) Nel presente studio sono stati acquisiti da questa fonte i dati relativi ai denominatori di popolazione canina dei comuni della provincia di Rieti nonché, per un subset dei dati sierologici, il dato relativo a sesso, età e razza di ciascun animale.

1.3.3 Carta di copertura/uso del suolo della regione Lazio

La Carta di Uso del Suolo (CUS) è una carta tematica di base che rappresenta lo stato attuale di utilizzo del territorio e si inquadra nell'ambito del Progetto CORINE Land Cover dell'Unione Europea, programma sperimentale per la raccolta, il coordinamento e la messa a punto delle informazioni sullo stato dell'ambiente e delle risorse naturali. Nel presente studio sono state considerate alcune specifiche coperture del suolo (tessuto urbano, % colture a uliveto). <http://www.urbanisticaecasa.regione.lazio.it/cusweb/>.

1.3.4 Banca Dati Nazionale dell'Anagrafe Zootecnica (BDN)

La banca dati informatizzata è stata istituita nel 2000 dal Ministero della Salute presso il CSN dell'Istituto "G. Caporale di Teramo". La BDN garantisce la tracciabilità e la rintracciabilità degli animali e dei loro prodotti, la tutela della salute pubblica e del patrimonio zootecnico, la programmazione dei controlli in materia di identificazione degli animali, l'erogazione e il controllo dei regimi di aiuto comunitari, le informazioni ai consumatori. Dalla BDN sono stati estratti i dati relativi alle aziende zootecniche nell'area di studio.

1.3.5 Ministero della Salute ed Agenzia Sanitaria Provinciale (ASP) della Regione Lazio

Il Ministero della Salute rappresenta l'organo finale del servizio di notifica informatizzato delle malattie infettive (SIMI). Il SIMI stabilisce l'obbligo di notifica (definendone modalità e tempi) per 47 malattie infettive classificate in 4 classi in base alla loro rilevanza di sanità pubblica ed al loro interesse sul piano nazionale ed internazionale. I medici che sospettano malattie infettive denunciabili tra le quali la LV e LC, hanno l'obbligo di farne comunicazione alla ASL che intraprende le misure sanitarie necessarie e, una volta confermati i casi, li comunica mensilmente all'organo regionale competente (Agenzia di Sanità Pubblica -ASP) dove dopo controlli di qualità sono trasmessi agli organi centrali (Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità, ISTAT). Qualora vengano riscontrate delle anomalie a livello centrale il dato da correggere viene segnalato al referente regionale che lo comunica alla ASL o al distretto competente, dove si provvede a modificarlo, in modo tale da avere, nel successivo

invio, dati corretti. Il flusso unidirezionale garantisce l'allineamento degli archivi periferici e centrali. [http://www.simi.iss.it/progetto_simi.htm#Organizzazione attuale](http://www.simi.iss.it/progetto_simi.htm#Organizzazione%20attuale)

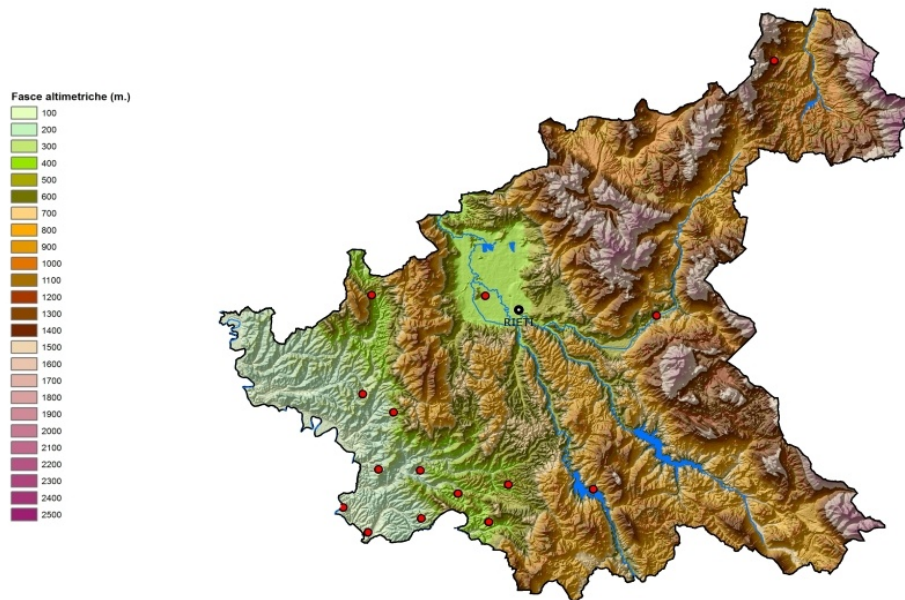
1.3.6 WorldClim

E' una raccolta di layers (strati informativi geografici) climatici globali di tipo raster ad alta risoluzione (celle di circa 1 km). Sono presenti layers di variabili climatiche come precipitazioni mensili, temperature medie, minime e massime. Si tratta di dati interpolati spazialmente sulla base di diverse migliaia di stazioni climatiche a distribuzione globale e di valori rilevati nell'arco di un cinquantennio (1950–2000). Su di essi si basano molti studi condotti a livello globale o locale da organismi internazionali che elaborano anche scenari futuri nel quadro del cambiamento climatico. Per il presente studio sono state usate le altitudini e le temperature (media delle medie e media delle minime mensili). (<http://www.worldclim.org/>)

1.3.7 Stazioni meteo ARSIAL

L'agenzia per la ricerca e l'innovazione in agricoltura della regione Lazio (ARSIAL) comprende al suo interno il Servizio Integrato Agrometeorologico della Regione Lazio (SIARL) che provvede ad acquisire, elaborare e diffondere dati ed informazioni di interesse agrometeorologico. Il SIARL svolge attività di rilevamento attraverso un sistema capillare di stazioni di telemisura distribuite sull'intero territorio regionale. La rete agrometeorologica è costituita da 89 stazioni elettroniche, dislocate su tutto il territorio: 11 in provincia di Frosinone, 12 in provincia di Latina, 15 in provincia di Rieti, 26 in provincia di Roma e 25 in provincia di Viterbo. Tutti gli apparati sono equipaggiati con un numero di sensori che, a seconda delle esigenze del sito, varia da un minimo di 3 a un massimo di 12. Tutte le stazioni sono alimentate per mezzo di un modulo fotovoltaico, integrato con batteria tampone e regolatore di carica, che le rende completamente autonome dal punto di vista energetico. La batteria tampone è dimensionata in modo da garantire la completa funzionalità degli apparati nel loro complesso, compresi quelli di comunicazione, per un periodo di almeno 5 giorni nella caso della configurazione più complessa. Le stazioni sono state installate rispettando le

prescrizioni dell'UCEA, i sensori installati sono conformi alle normative W.M.O. (World Meteorological Organization) e le apparecchiature sono prodotte da aziende quali: SIAP, CAMPBELL e MTX. Le grandezze rilevate a cadenza oraria sono: temperatura dell'aria, umidità, precipitazione, direzione e velocità del vento, pressione, radiazione fotosintetica (PAR), temperatura del terreno, radiazione solare, bagnatura fogliare, umidità terreno, evaporato. Le aggregazioni temporali per tutte le misure rilevate sono giornaliere, decadali, mensili e annuali. Esse sono pubblicate quotidianamente sul portale istituzionale di ARSIAL (Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione dell'Agricoltura). (<http://www.arsial.it/portalearsial/agrometeo/>) Nel presente studio sono stati utilizzati i dati giornalieri di temperatura (media, minima



massima) umidità media, precipitazioni e velocità media del vento registrati da alcune stazioni climatiche ricadenti vicino ai siti di cattura dei flebotomi. Le stazioni 15 stazioni presenti in provincia di Rieti sono rappresentate in figura (**Figura 5**).

Figura 5. Stazioni ARSIAL nella provincia di Rieti.

2. PRESENZA E DIFFUSIONE DELLA LCan

Per la valutazione della presenza e diffusione della leishmaniosi nel serbatoio canino è stato costruito, attingendo al SIL, un dataset (**Dataset 1**) in cui sono registrati tutti i casi testati per Lcan dall'IZSLT della Provincia di Rieti nel periodo 2006-2013. Sono stati considerati come casi positivi di LCan titoli $\geq 1/80$ in immunofluorescenza indiretta (IFI). La sieroprevalenza grezza per leishmania (positivi/testati) è stata calcolata per i 31 comuni della provincia e correlata. Sul Dataset 1 è stata valutata la correlazione tra sieroprevalenza comunale ed alcune variabili climatiche quali altitudine (quota media per comune-*WorldClim*), temperatura (Tmed e Tmin su 7 mesi), uso copertura del suolo (percentuale di copertura su superficie comunale). Sono stati esclusi i comuni che hanno conferito meno di 5 campioni nel periodo considerato.

Successivamente è stato creato un subset dei dati precedenti (**Dataset 2**) prendendo in considerazione solo i valori dei soggetti provvisti di microchip tracciati su SIL ed ACIRL. Sul Dataset 2 è stata valutata la presenza di differenze statisticamente significative tra sani e infetti in relazione all'età (in giorni), al sesso (M/F) alla razza (meticcio/di razza) e l'associazione tra titolo sierologico (suddiviso tra sani, e 3 titoli sierologici: 1/80, 1/160, $\geq 1/320$) e razza.

La prevalenza media annuale di Lcan del periodo 2006-2013 è stata calcolata ponderando la sieroprevalenza grezza di LCan (**Dataset 1**) attraverso dei pesi costruiti sul rapporto tra numero degli animali testati (n testati comune) e il numero degli animali presenti nel comune (popolazione comune) secondo la formula:

come suggerito dalla guida EFSA (The EFSA Journal (2009) 253, 1-77). Sulla base di questo calcolo è stato valutato l'andamento (trend) annuale nella provincia.

3. PRESENZA E DIFFUSIONE DI LV ED LC

Sono stati ricercati i casi di LV e LC del periodo 2000-2013 diagnosticati in pazienti residenti in provincia di Rieti. Si è scelto di valutare i casi su un periodo più ampio rispetto a quello considerato per il serbatoio canino in quanto la frequenza dei casi umani è notoriamente inferiore. Sono stati inizialmente consultati i dati del Ministero della Salute disponibili online per la consultazione o il trasferimento http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=812&area=Malattie%20infettive&menu=vuoto. Rendendoci conto che aggiornamento dei dati era al 31 dicembre 2009 ci siamo rivolti all’Agenzia di Sanità Pubblica (ASP) della Regione Lazio per reperire dati sugli ultimi anni del periodo di studio. Il domicilio dei pazienti non ci è stato fornito per questioni di privacy.

4. MONITORAGGIO DEI VETTORI

Le catture sono state effettuate per due stagioni consecutive di attività dei flebotomi (Figura 6).

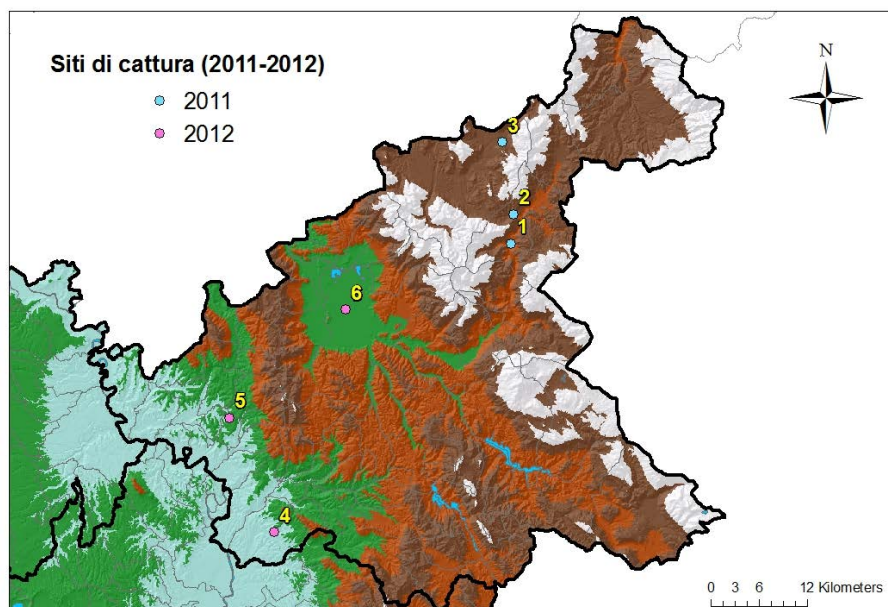


Figura 6. Siti di cattura (2011-2012).

4.1 Prima stagione di catture (2011)

Nella prima stagione (Agosto-Ottobre 2011) le catture sono state effettuate secondo il metodo del transetto posizionando le trappole in tre aziende zootecniche a quote crescenti partendo dai 600 m s.l.m. come descritto da alcuni autori (Guernaoui et al., 2006) I siti di cattura sono stati scelti ricercando nella in BDN le aziende bovine con n capi > di 0. Le aziende sono state riportate su mappa e tramite GIS sono state rilevate quelle poste ad altitudini superiori ai 500 m s.l.m. (**Figura 7**).

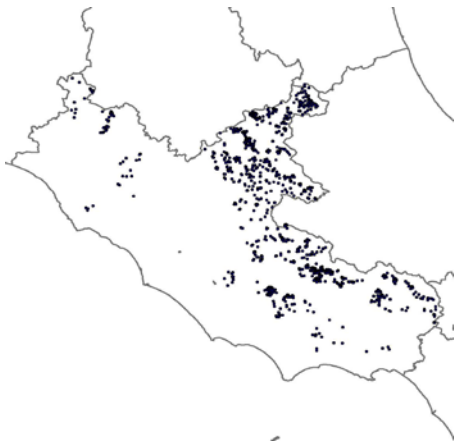


Figura 7. Aziende presenti al di sopra di 500 m s.l.m.

Tramite la mappa prodotta sono state selezionate tre aziende zootecniche situate rispettivamente a 600, 800 e 1100 m s.l.m. Le caratteristiche dei siti per il monitoraggio dei flebotomi sono riportati in tabella (**Tabella 1**). Le catture sono state effettuate a cadenza quindicinale mediante trappole luminose modello Onderstepoort (**Figura 8**). Le trappole sono state posizionate al tramonto e ritirate il mattino seguente. Le catture sono state condotte fino a negativizzazione dei siti.

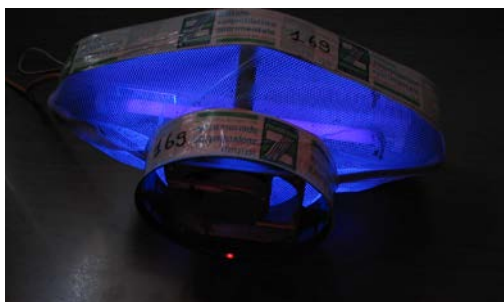


Figura 8. Trappola di cattura a luce modello “Onderstepoort”

4.2 Seconda stagione di catture (2012)

Scelta dei comuni

Al fine di scegliere i comuni per il monitoraggio entomologico è stato condotto uno studio preliminare su alcune variabili: i) sieroprevalenza nel serbatoio canino, ii) presenza di casi umani di LV e LC iii) presenza di aziende zootecniche con animali ospiti iiii) presenza di stazioni climatiche. La vicinanza delle stazioni climatiche è stata scelta per valutare l'eventuale correlazione con fattori abiotici come descritto da alcuni autori (Maroli et al., 2008, Rossi et al., 2008, Dantas-Torres et al., 2014, Gaglio et al., 2014). E' stato assegnato ai comuni un punteggio da 1 a 4 in base a queste variabili (**Figura 9-10; Tabella 2**) La presenza di animali ospiti essendo uniformemente diffusa non è stata inclusa nel punteggio.

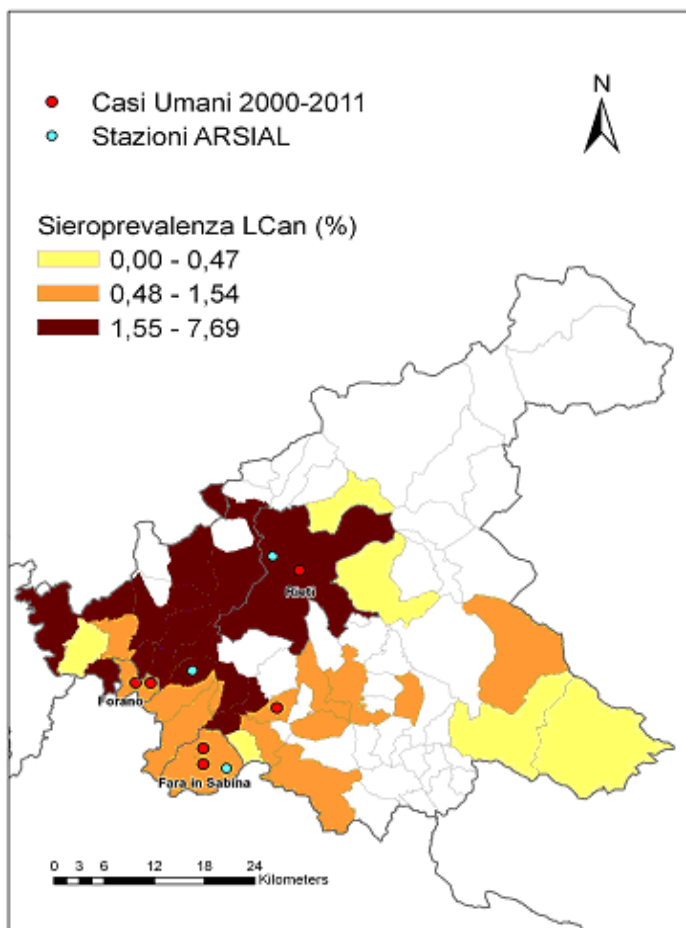


Figura 9. Sieroprevalenza Lcan (PLCan*), casi di LV, stazioni climatiche

Plcan*= [(casi confermato**/popolazione canina ACIRL)*100]. **Caso confermato Lcan= titolo IFI>= 1/160 secondo D.G.R. 473/2010

Tabella 2. Punteggi assegnati ai comuni in base a i) sieroprevalenza leishmaniosi canina (P LCan) ii) presenza di casi umani (LV) iii) presenza di stazione climatica

P LCan	LV	St ARSIAL	punteggio
Bassa*=0	No=0	No=0	0
Bassa=0	No=0	Si=1	1
Bassa=0	Si=1	No=0	
Media**=1	No=0	No=0	
Alta***=2	No=0	No=0	2
Media=1	No=0	Si=1	
Media=1	Si=1	No=0	
Bassa=0	Si=1	Si=1	
Alta=2	Si=1	No=0	
Alta=2	No=0	Si=1	3
Media=1	Si=1	Si=1	
Alta=2	Si=1	Si=1	
Alta=2	Si=1	Si=1	4

* 0-0,47% **0,48-1,54% ***1,55-7,69%

Sono stati scelti tre comuni ad elevato punteggio:

- ✦ Fara in Sabina: punteggio 3 (PLCan media, presenza di LV, presenza di stazione climatica)

- ⤴ Cantalupo in Sabina: punteggio 4 (PLCan alta, presenza di LV, presenza di stazione climatica)
- ⤴ Rieti: punteggio 4 ((PLCan alta, presenza di LV, presenza di stazione climatica)

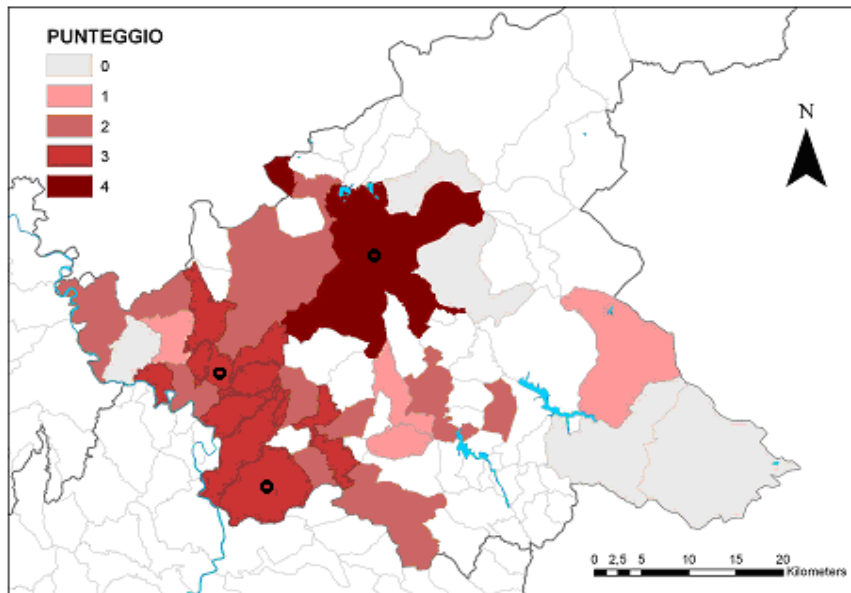


Figura 10. Rappresentazione dei comuni della Provincia di Rieti con il relativo punteggio. Sono indicati i comuni scelti per le catture: Fara in Sabina, Cantalupo e Rieti.

Scelta dei siti

I siti di cattura nei comuni selezionati sono stati individuati valutando la distribuzione delle aziende zootecniche in un buffer di 5 km rispetto alle stazioni climatiche (**Figura 11**). Le aziende scelte non distavano più di 2 km dalla stazione climatica, in considerazione del fatto che i flebotomi hanno capacità di volo che raramente superano i 2-3 km (Killick-Kendrick et al., 1984, Maroli et al., 2013).

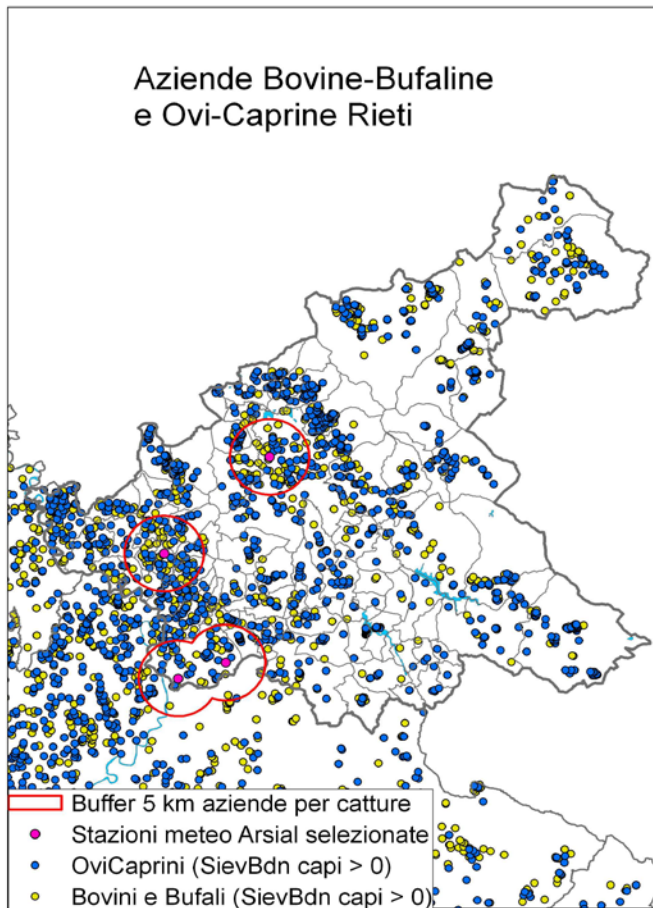


Figura 11 Stazioni climatiche e buffers all'interno dei quali sono state scelte le aziende per effettuare le catture.

I siti scelti sono stati: (i) Talocci nel comune di Fara in Sabina, (ii) Rionasso nel comune di Cantalupo e Piana di Rieti nel comune Rieti (**Tabella 1**).

Lo studio dei flebotomi è potuto iniziare solo a Luglio ed è continuato fino a tutto il mese di Ottobre (Luglio-Ottobre 2012). Nel 2012, le catture, con cadenza quindicinale, oltre che con le trappole a luce (Onderstepoort), poste nei ricoveri degli animali, sono state effettuate anche con trappole adesive (Figura xxx). Queste, note anche con il nome di Sticky traps (=ST), costituite da fogli di carta (20X20 cm) imbevuti di olio di ricino, sono state poste sia nei ricoveri degli animali che nelle fessure dei “barbacani” reperite nelle immediate vicinanze. Entrambi i tipi di trappole sono rimasti in opera per due notti consecutive.



Figura 12. Trappole adesive in fessura di barbacane e sulle pareti di un pollaio.

Tabella 1. Caratteristiche dei siti arruolati per il monitoraggio dei flebotomi in provincia di Rieti negli anni 2011 e 2012.

No. sito	Località	Comune	Altitudine (m.s.l.m.)	Coord.	Ambiente	Ospiti
<i>2011</i>						
1	Sigillo	Posta	600	42,4966 13,0802	AZ	ov,eq,cn
2	Posta (Cerqua)	Posta	800	42,5291 13,0855	AZ	bv,eq,av
3	Terzone	Leonessa	1100	42,6097 13,0736	AZ	bv
<i>2012</i>						
4	Talocci	Fara in Sabina	120	42,1879 12,7042	AZ	bv,ov,eq, av,su,cn, gc,lc
5	Rionasso	Cantalupo	200	42,3170 12,6446	Vivaio	av,cg,cn, gt,gc,lc
6	Piana di Rieti	Rieti	398	42,4315 12,8261	AZ	bv,av,gc lc

(*) AZ = Azienda Zootecnica. bv=bovini ov=ovini, eq=equini, av=avicoli, su=suini, cg=conigli, cn=cani, gt=gatti, gc=gechi lc=lucertole.

5. ALLESTIMENTO DEI PREPARATI ED IDENTIFICAZIONE

Gli insetti sono stati posti in etanolo al 70 % + glicerolo in attesa di essere identificati e suddivisi in ♂ e ♀.



Figura 13. Allestimento dei preparati-chiarificazione.

♂: chiarificati con cloralattofenolo (**Figura 13**) per 48 ore e montati su vetrino con balsamo del Canada per riconoscimento di specie.

♀: sezionate in 2 parti:

- ♣ ultimi 4 segmenti addominali: chiarificati con cloralattofenolo per 48 ore e montati su vetrino con Balsamo del Canada per il riconoscimento di specie
- ♣ la restante parte: posta in etanolo al 70 % + glicerolo in attesa di essere sottoposta a ricerca di *Leishmania* spp. mediante metodi biomolecolari.

6. RICERCA DI *Leishmania* spp. NEI FLEBOTOMI MEDIANTE PCR

Alcune delle femmine di Phlebotominae catturate (n292), comprendenti tutti i *Phlebotomus* spp (n13) ed una parte delle *S.minuta* (n 279), sono stati sottoposti ad estrazione dell'acido nucleico utilizzando alte temperature (bollitura) o un kit commerciale. Per verificare l'efficacia delle procedure di estrazione del DNA di leishmania è stato messo a punto un controllo interno di estrazione con una PCR volta

ad amplificare una porzione del 18s rRNA comune ai flebotomi del Vecchio e Nuovo Mondo (Kato et al., 2005). I campioni risultati positivi al controllo interno di estrazione sono stati sottoposti a 16S nPCR per *Leishmania* spp. (Van Eys et al., 1992). Gli esemplari appartenenti al genere *Phlebotomus* spp. sono stati lavorati singolarmente mentre gli esemplari di *Sergentomya minuta* sono stati lavorati in parte in pool ed in parte in singolo. I campioni risultati positivi per *Leishmania* spp. sono stati sottoposti ad identificazione di specie mediante ITS1 nPCR RFLP (Shonian et al., 2003). Le amplificazioni sono state effettuate utilizzando i termociclatori 9700 GeneAmp PCR System (Applied Biosystems) e iQ Cyclers (BioRad).

6.1 Estrazione del DNA

In entrambi i metodi di estrazione utilizzati gli insetti sono stati posti ad evaporare su carta bibula sotto cappa a flusso laminare per 30 minuti.

- Metodo di estrazione per bollitura: gli insetti sono stati trasferiti su piastre Petri sterili e sottoposti a 2 lavaggi con *phosphate buffer saline* (PBS), pH 7.2 ± 0.2 per un totale di circa 30 minuti. Dopo tale incubazione i campioni sono stati trasferiti in provette Eppendorf da 1,5 ml singolarmente o in pool e posti ad incubare in termomixer (Thermomixer Comfort – Eppendorf) a 99 °C per 3 ore.

- Kit commerciale: è stato utilizzato il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) apportando alcune modifiche alle istruzioni fornite dal produttore effettuando inizialmente una lisi meccanica omogeneizzando l'insetto mediante pestello in 200 µl del tampone di lisi *Tissue Lysing Buffer* (ATL). Successivamente è stata effettuata una lisi enzimatica aggiungendo 30 µl di proteinasi k (PK) e incubando in termomixer (Thermomixer Comfort – Eppendorf) a 56°C per 3 ore. Sono stati quindi aggiunti 200 µl del *Lysing Buffer* (AL) ed è stata effettuata una seconda incubazione in termomixer a 70°C per 10 minuti. I campioni sono stati centrifugati a 8000 rpm per 1 minuto. Il surnatante (300-400 µl) è stato prelevato e trasferito in provette Eppendorf sterili da 1.5 ml. Sono stati aggiunti 400 µl di etanolo assoluto ed i campioni sono stati vortexati per 20 secondi quindi centrifugati a 8000 r.p.m per 1 minuto. Il surnatante è stato trasferito su colonnine a scambio ionico fornite dal Kit contenenti resine che trattengono il DNA. Le colonnine sono state centrifugate a 8000 rpm per 1 minuto. Il filtrato è stato eliminato e la colonnina è stata trasferita su un nuovo porta colonna. Al fine di

eliminare la quota di proteine, fenoli e polisaccaridi eventualmente presenti nella miscela della colonnina, sono stati effettuati 2 lavaggi consecutivi da 500 µl ciascuno con specifici tamponi (AW1 e AW2) mediante centrifugazione ad 8000 rpm per 1 minuto seguite da eliminazione del filtrato e cambio del porta colonna. Dopo l'ultimo lavaggio è stata effettuata una centrifugazione finale senza l'aggiunta di tampone a 13200 rpm per 1 minuto per eliminare i residui dei tamponi utilizzati. Le colonnine sono poi state poste su Eppendorf sterili da 1,5 ml. Sono stati aggiunti 50 µl di tampone *Elution Buffer* (AE) incubando a temperatura ambiente per 5 minuti. Le colonnine sono state sottoposte a centrifugazione a 8000 r.p.m per 1 minuto. Quest' ultimo step è stato ripetuto una seconda volta ottenendo quindi un volume di eluizione finale di 100 µl.

6.2 Dosaggio degli acidi nucleici

La purezza degli acidi nucleici estratti è stata valutata tramite lettura fotometrica (BioPhotometer plus, Eppendorf, Germany). In particolare la lunghezza d'onda (λ) pari di 260 nm è stata rilevata per il DNA, 280 nm per le proteine ed i fenoli, 230 nm per i residui di zuccheri, sali o solventi organici e 340 nm per misurare la torbidità della soluzione. Tali parametri vengono distinti :

Il rapporto $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$ è utilizzato per stimare la purezza della preparazione di acidi nucleici. Tale rapporto deve essere uguale a 1.8.

6.3 18S rRNA PCR

Per escludere la presenza di falsi negativi è stato messo a punto un controllo interno di estrazione amplificando un frammento del gene che codifica per il 18S rRNA. Il 18S è una sequenza genica della piccola subunità ribosomiale che risulta altamente conservata nelle specie di flebotomi del Vecchio e Nuovo Mondo (Aransay et al., 1999; Kato et al., 2005, Terayama et al., 2008). I primers Lu. 18S rRNA-1S e Lu. 18S rRNA-1R (Kato et al., 2005), sono riportati in **Tabella 3**.

Tabella 3. Sequenza degli oligonucleotidi usati per il 18S rRNA.

Primers	Sequenza 5'-3'	Prodotto di amplificazione
Lu. 18S rRNA-1S	TGCCAGTAGTTATATGCTTG	450 bp
Lu. 18S rRNA-1R	TTACGCGCCTGCTGCCTTCC	

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati nell'amplificazione sono state controllate utilizzando l'interfaccia web di BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La Mix di reazione per l'amplificazione del 18s rRNA ed il ciclo termico della PCR sono di seguito riportati (**Tabella 4-5**).

Tabella 4. Mix di reazione per l'amplificazione del 18S rRNA.

Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	µl per reazione
Pcr Gold Buffer	10 x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
dNPTs	10 mM	0.2 mM	1
Lu. 18S rRNA-1S	50 µM	0.1 µM	0.1
Lu. 18S rRNA-1R	50 µM	0.1 µM	0.1
Ampli-taq Gold	5U/ µl	1U/reazione	0.2
H ₂ O	-	-	35.6
DNA	-	-	5
Volume di reazione	-	-	50 µl

Tabella 5. Protocollo termico della reazione di amplificazione del 18S rRNA.

Fasi del ciclo	Temperature	Tempi	
Denaturazione iniziale	94°C	5 min	
Denaturazione	94°C	30 sec	35 cicli
Annealing	56°C	30 sec	
Estensione	72°C	60 sec	
Estensione finale	72°C	5 min	

I prodotti delle reazioni di amplificazione (10 µl ciascuno) sono sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5% in TAE 1X con GelRed Nucleic Acid Stain e visualizzati mediante raggi UV, ponendo come controllo dell'altezza dell'amplificato un peso molecolare di 50 bp (GeneRuler 50bp DNA Ladder, Thermo Scientific).

6.4 16S rRNA nPCR

Per la ricerca del DNA di *Leishmania* spp. è stato applicato un protocollo di nPCR che amplifica la sequenza che codifica per la piccola subunità ribosomiale (SSU rRNA o 16S rRNA) dotato di elevata sensibilità diagnostica. Sono stati utilizzati i primers 221 e 332 nella first e 222 e 333 nella nested come descritto da alcuni autori (Van Eys et al., 1992).

Durante l'esecuzione delle reazioni sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitarne la contaminazione. In ogni reazione di amplificazione sono stati aggiunti un controllo positivo e un controllo negativo. Il controllo negativo di reazione, costituito da acqua sterile per biologia molecolare, è stato utilizzato per valutare fenomeni di trascinarsi dei campioni e quindi escludere la presenza di falsi positivi. Il controllo positivo di reazione, è estratto da ceppo di riferimento *L. infantum* (IPT1).

I prodotti della reazione (10 µl ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5% in TAE buffer con l'aggiunta di GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, 10.000x in H₂O) e visualizzati mediante raggi UV, ponendo come controllo

dell'altezza dell'amplificato un peso molecolare di 50 bp (GeneRuler 50bp DNA Ladder, Thermo Scientific).

Il prodotto di amplificazione corrisponde ad una banda di 393 bp.

La sequenza dei *primers* utilizzati, la preparazione della Mix di reazione ed il ciclo termico sono riportati di seguito (**Tabella 6-11**).

Tabella 6 Sequenza degli oligonucleotidi 16S rRNA nPCR (first)

Primers	Sequenza 5'-3'	Prodotto di amplificaz
221	GGTTCCTTTCCTGATTTACG	603 bp
332	GGCCGGTAAAGGCCGAATAG	

Tabella 7 Mix di reazione 16S rRNA nPCR (first)

Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	µl per reazione
Pcr Gold Buffer.	10 x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	4
dNTPs	10 mM	0.4 mM	2
BSA	1mg/ml	50µg/ml	2,5
Primer-221	50 µM	0.4 µM	0,4
Primer-332	50 µM	0.4 µM	0,4
Ampli-taq-Gold	5U/ µl	2.5 U/tot	0,5
H ₂ O	-	-	33,2
DNA	-	-	2

Volume finale			50
---------------	--	--	----

Tabella 8 Protocollo termico 16S rRNA nPCR (first).

Fasi del ciclo	Temperature	Tempi	
Denaturazione iniziale	94°C	5 min	
Denaturazione	94°C	1 min	15 cicli
Annealing	58°C	1 min	
Estensione	72°C	1 min	
Estensione finale	72°C	5 min	

Tabella 9 Sequenza degli oligonucleotidi 16S rRNA nPCR (nested).

Primers	Sequenza 5'-3'	Prodotto di amplificaz
222	TATTGGAGATTATGGAGCTG	393bp
333	AAAGGCGGGCGCGGTGCTG	

Tabella 10 Mix di reazione 16S rRNA nPCR (nested).

Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	µl per reazione
Pcr Gold Buffer.	10 x	1x	2.5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2
dNTPs	10 mM	0.4 mM	1
BSA	1mg/ml	50µg/ml	1.25

Primer-222	50 μ M	0.4 μ M	0.2
Primer-333	50 μ M	0.4 μ M	0.2
Ampli-taq-Gold	5U/ μ l	2.5U/tot	0.3
H ₂ O	-	-	16.55
DNA	-	-	1
Volume finale	-	-	25

Tabella 11 Protocollo termico 16S rRNA nPCR (nested).

Fasi del ciclo	Temperature	Tempi	
Denaturazione iniziale	94°C	5 min	
Denaturazione	94°C	1 min	30 cicli
Annealing	58°C	1 min	
Estensione	72°C	1 min	
Estensione finale	72°C	5 min	

6.5 ITS1 PCR-RFLP

L'identificazione di *Leishmania* spp. a livello di specie è stata effettuata mediante l'amplificazione di un gene che codifica per una regione caratterizzata da polimorfismi di un singolo nucleotide (SNPs) tali da permettere l'identificazione della maggior parte delle specie di *Leishmania* del Vecchio e Nuovo Mondo se digerita con specifici enzimi di restrizione (RFLP). E' stata amplificata la regione ITS1 (regione spaziatrice trascritta), localizzata tra piccola (SSU) e grande subunità ribosomiale (LSU). L'amplificato è stato digerito con l'enzima di restrizione *HaeIII* (Shonian et al 2003). Il

pattern di restrizione delle principali specie di interesse medico del Vecchio e Nuovo mondo è mostrato di seguito (**Tabella 12**).

Tabella 12 ITS1-RFLP delle differenti specie di *Leishmania*.

Specie	<i>Don</i> *	<i>Inf</i> *	<i>Aet</i>	<i>Tro</i>	<i>Maj</i>	<i>Tur</i>	<i>Mex</i>	<i>Ama</i>	<i>Bra</i>	<i>Guy</i> **	<i>Pan</i> **
HaeIII	184	184	200	185	203	203	186	186	156	156	156
	75	72	57	57	132	57	88	142	143	137	139
	54	55	54	53		53	59				
			23	24		24					

*Specie del Vecchio Mondo con pattern di restrizione dell'ITS1 difficilmente distinguibile.

**Specie del Nuovo Mondo con pattern di restrizione dell'ITS1 difficilmente distinguibile.

- **ITS1 PCR**

E' stata utilizzata la soluzione pronta all' uso GoTaq® Green Master Mix (Promega) contenente al suo interno loading Buffer, Buffer, MgCl₂, dNTPs, *Taq* DNA polymerase, alla quale sono stati aggiunti i primers e l'acqua per un volume di reazione di 50 µl. Il prodotto di amplificazione corrisponde ad una banda di circa 300 bp.

Per ogni campione sono stati aggiunti:

MM 25 µl

H₂O nuclease free 13 µl

Primer- LITSR (25pmol/µl) TGATACCACTTATCGCACTT 1 µl

Primer- 5.8 S (25pmol/µl) CTGGATCATTTTCCGATG 1 µl

10 µl di dna

I controlli positivi sono costituiti da dna estratto dai seguenti ceppi di riferimento: *Sauroleishmania tarentolae* (RTAR/FR/78/LEM124), *Trypanosoma platydictyli* (IMIN/IT/87/ISST15) ed *L. infantum* ZMON-1 (MHOM/TN/80/IPT1). Il campione negativo è costituito da acqua sterile per biologia molecolare. Il protocollo termico utilizzato è mostrato in **Tabella 13**.

Tabella 13 Protocollo termico ITS1 PCR.

Fasi del ciclo	Temperature	Tempi	
Denaturazione iniziale	95	2 min	
Denaturazione	95	30 sec	32 cicli
Annealing	53	30 sec	
Estensione	72	1 min	
Estensione finale	72	6 min	

3 μ l dell' amplificato ottenuto è stato utilizzato come template in una seconda PCR (PCR nested) utilizzando gli stessi primers e protocollo termico (**Tabella 13**) per un volume di reazione di 50 μ l. I prodotti delle reazioni di amplificazione (12 μ l ciascuno) sono stati sottoposti a migrazione elettroforetica su gel di agarosio all'3% in TAE 0,5 X contenente etidio bromuro (10mg/ml) (SIGMA) ponendo come controllo dell'altezza dell'amplificato un peso molecolare di 100 bp. La corsa elettroforetica è stata eseguita a 80V per circa 1 ora e visualizzata mediante raggi UV. I campioni che risultavano positivi venivano sottoposti a digestione enzimatica con endonucleasi di restrizione.

- **RFLP**

La mix di digestione per un volume di reazione di 20 μ l è stata preparata aggiungendo per ogni campione

1 μ l di HaeIII (Promega)

2 μ l di Buffer

7 μ l di H₂O nuclease free

10 μ l di amplificato

I campioni sono incubati overnight a 37°C in Termomixer (T Shaker EuroClone).

1.RISULTATI

Presenza e diffusione di LCan

1.1 Sieroprevalenza grezza (Dataset 1)

La sieroprevalenza grezza per LCan (2006-2013) è risultata compresa 0 e 76,9%.

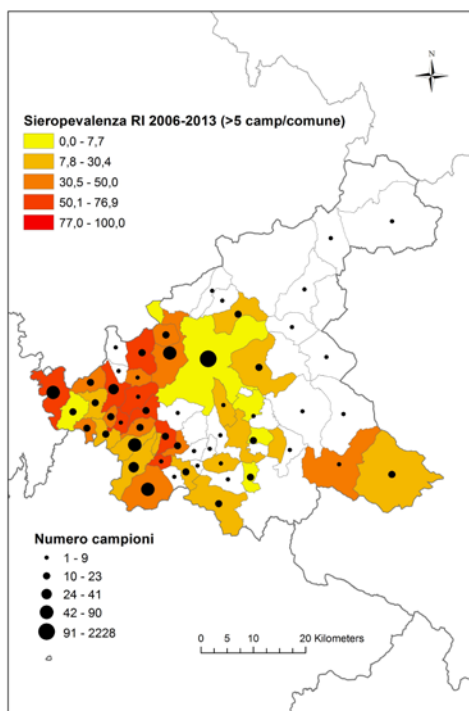


Figura 14. Distribuzione della sieroprevalenza grezza (2006-2013), numero di campioni testati per comune.

1.2 Sieroprevalenza e altitudine

Non è stata trovata alcuna correlazione ($r=-0.047$, $p=0.800$) tra sieroprevalenza ed altitudine media comunale. Anche provando a ripetere l'analisi categorizzando l'altitudine in 3 classi (0-200, 200-600, >600) non è stato ottenuto un risultato significativo ($p=0.870$) (**Figure 15-16**).

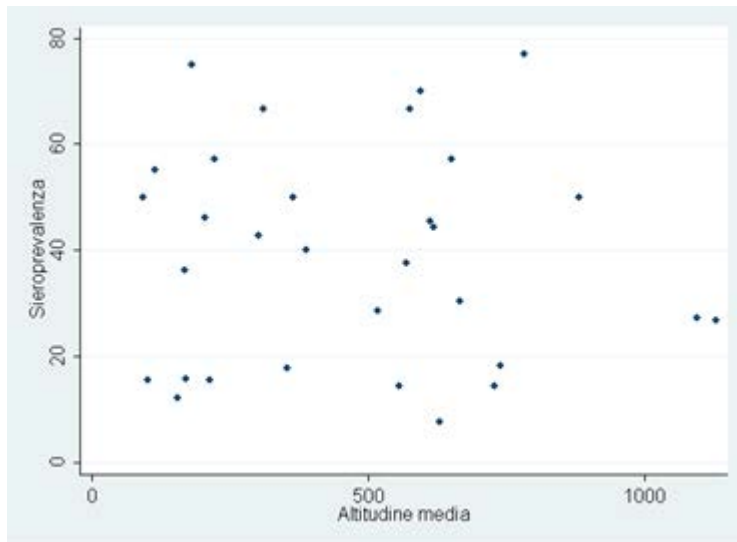


Figura 15. Sieroprevalenza ed altitudine media comunale.

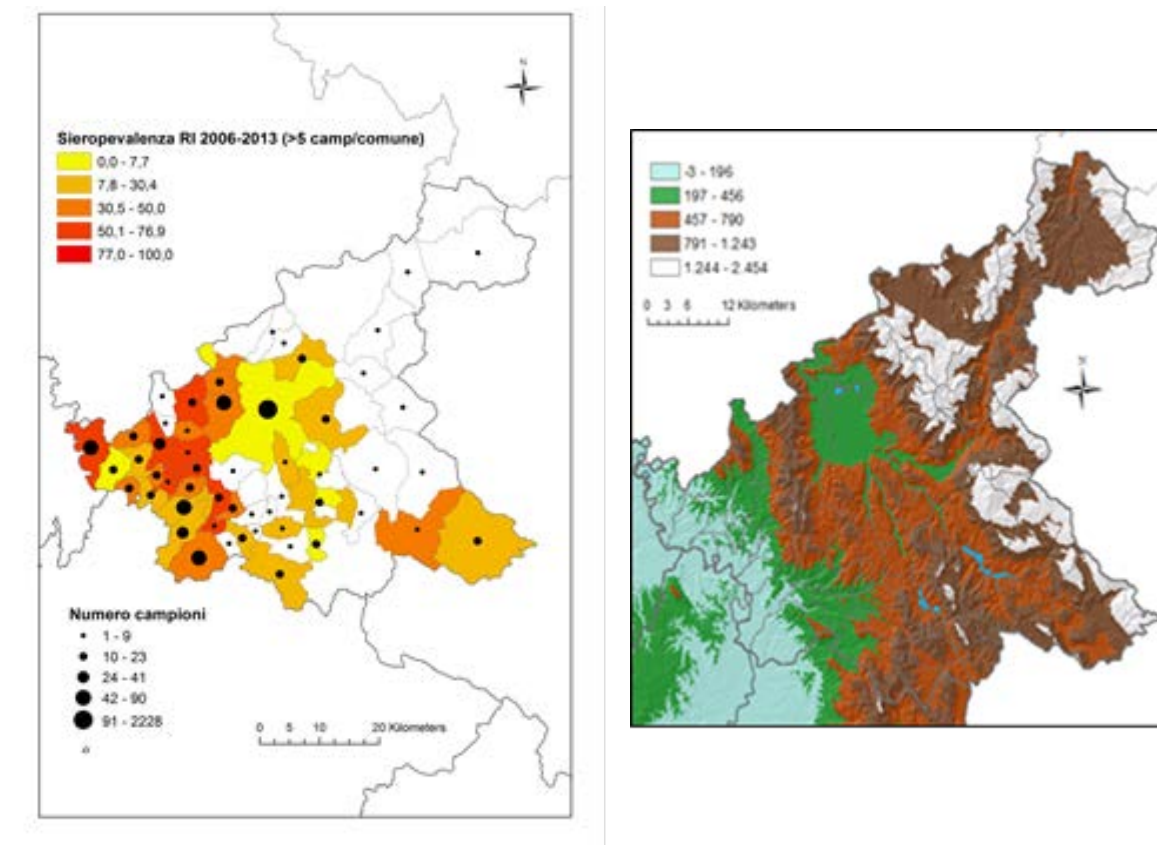


Figura 16. Sieroprevalenza e fasce altitudinali (m s.l.m) della provincia di Rieti.

1.3 Sieroprevalenza e Tmed

Non è stata trovata alcuna correlazione ($r=0.067$, $p=0.718$) tra sieroprevalenza e temperatura media. Anche in questo caso si è provato a ripetere l'analisi categorizzando la temperatura media in 3 classi (0-14, 14-16, 16-19) senza ottenere significatività ($p=0.283$) (**Figura 17**).

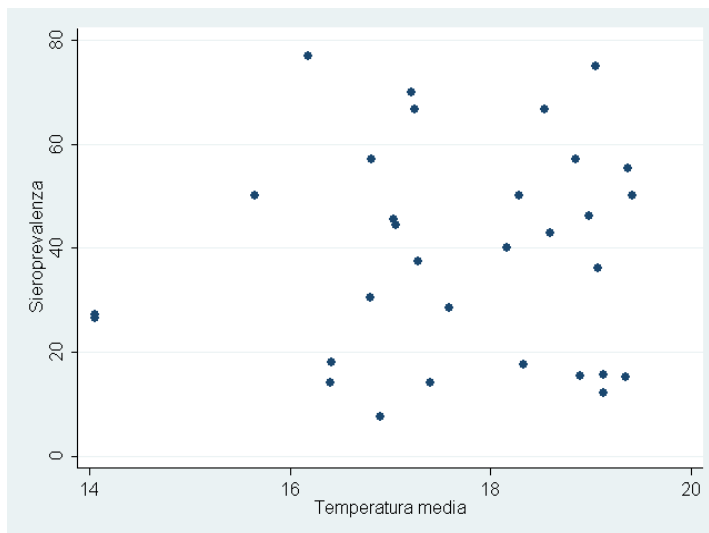


Figura 17. Sieroprevalenza e Tmed(°C).

1.4 Sieroprevalenza e Tmin

Non è stata rilevata alcuna correlazione ($r=0.116$, $p=0.534$) tra sieroprevalenza e temperatura minima. Anche in questo caso abbiamo provato a categorizzare la temperatura minima (0-9, 9-11, 11-13) senza ottenere significatività ($p=0.594$) (**Figura 18**).

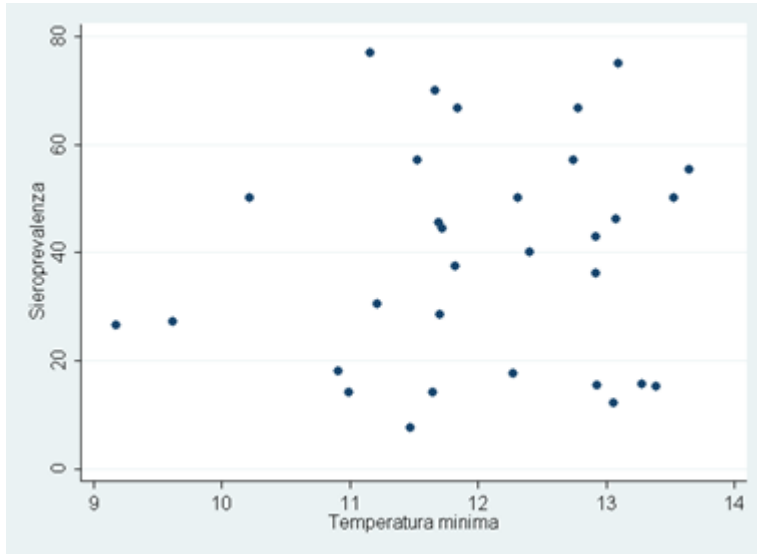


Figura 18. Sieroprevalenza e Tmin (°C).

1.5 Sieroprevalenza e copertura % di uliveti

Valutando la correlazione tra sieroprevalenza e la percentuale di copertura di uliveti non sono state riscontrate correlazioni statisticamente significative ($r=0.012$, $p=0.9472$) (Figure 19-20).

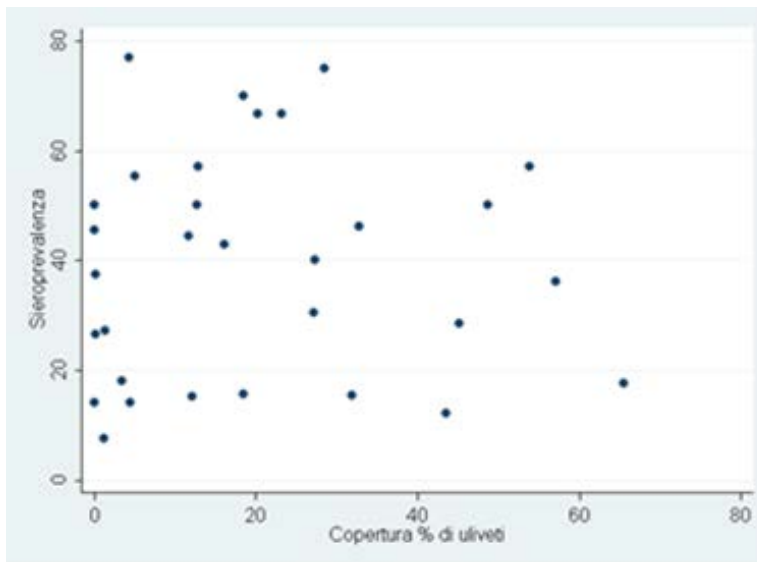


Figura 19. Sieroprevalenza e copertura di uliveti.

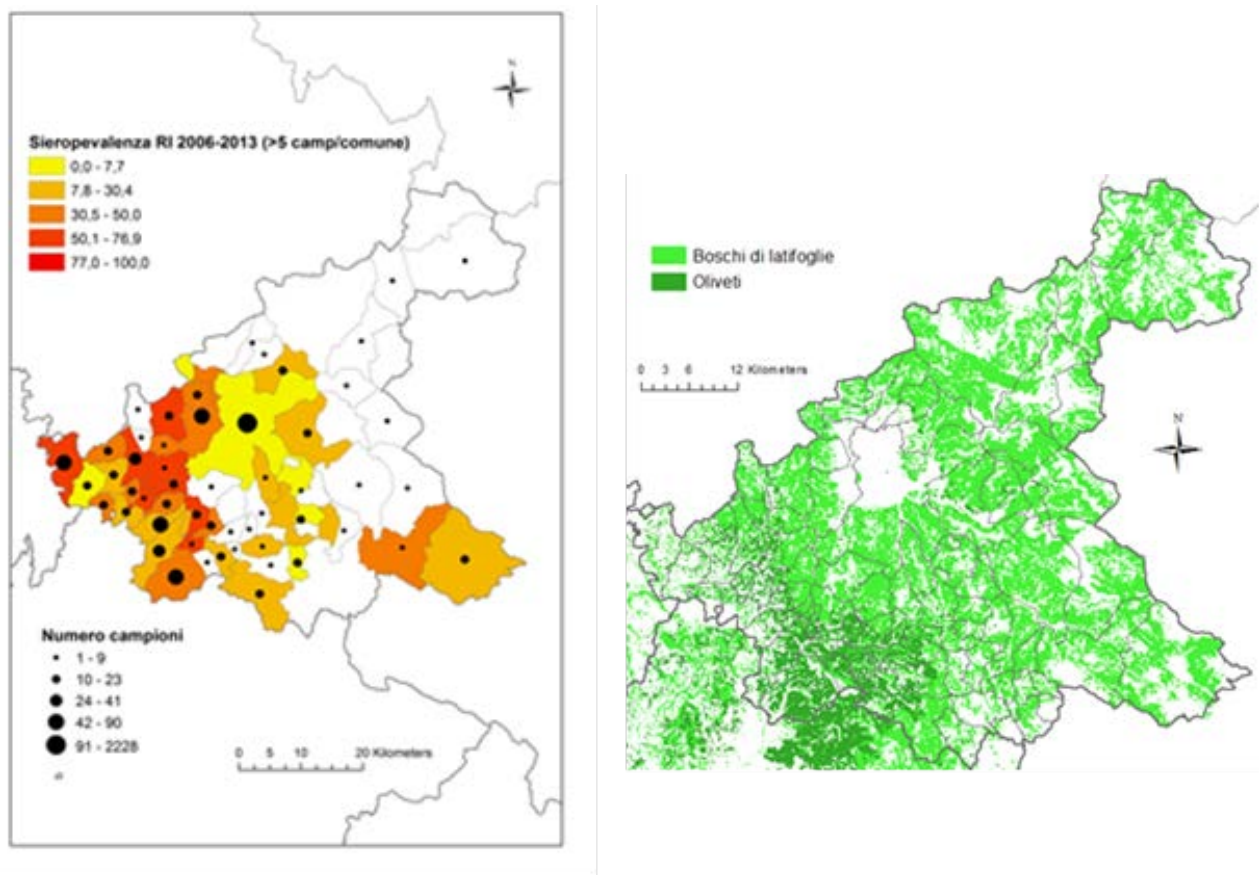


Figura 20. Sieroprevalenza e copertura % di uliveti

1.6 Sieroprevalenza e copertura % di tessuto urbano

Valutando la correlazione tra sieroprevalenza e la percentuale di copertura di tessuto urbano non sono state riscontrate correlazioni statisticamente significative ($r=0.335$, $p=0.065$) (**Figure 21-22**)

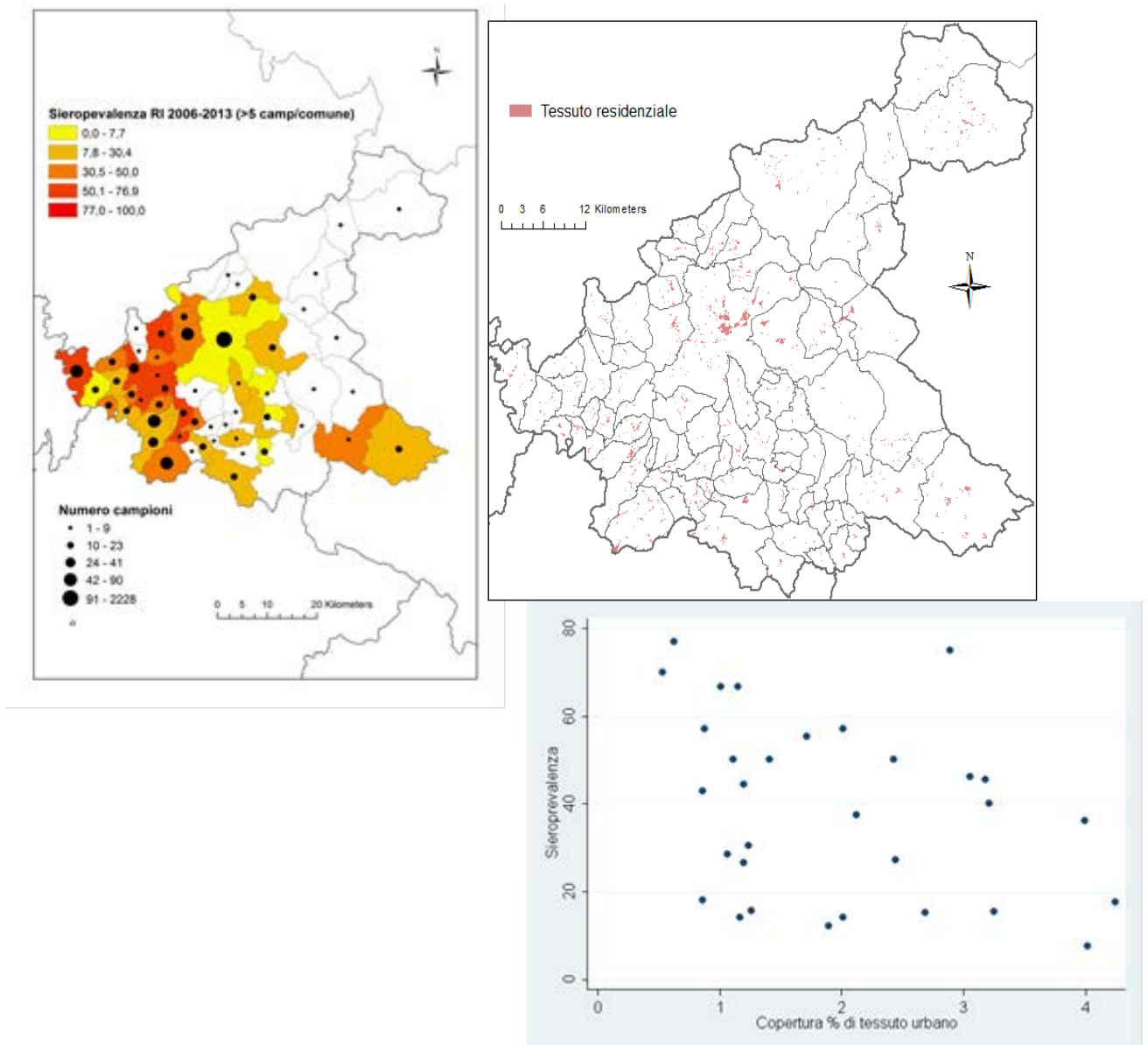


Figura 21. Sieroprevalenza e copertura % di tessuto urbano

Figura 22. Sieroprevalenza e copertura % di tessuto urbano.

(Dataset2)

1.7 Infezione ed età

Sono state trovate differenze significative ($p < 0.01$) tra età mediana dei cani sani e età mediana degli infetti. I cani infetti ($n=103$) risultano essere più vecchi (1096 gg, range 713-1787gg) rispetto a quelli sani ($n=1237$, 777gg, range 476-1393gg) .

1.8 Infezione e razza

E' stata osservata un'associazione significativa $p < 0.001$ tra infezione e razza: tra i sani, il rapporto tra cani di razza e meticci è 292/945, mentre tra gli infetti tale rapporto è significativamente più alto (44/59). In particolare si osserva che all'aumentare del titolo IFI aumenta la percentuale di cani di razza e diminuisce quella dei meticci (**Tabella 14**).

Tabella 14. Titolo e razza.

TITOLO	di razza	meticcio	Totale
negativo	292	945	1.237
1/80	13	24	37
1/160	5	7	12
$\geq 1/320$	26	28	54
Totale	336	1.004	1.34

1.9 Infezione e sesso

E' stata rilevata un'associazione al limite della significatività ($p=0.034$) tra sanità/infezione e sesso (F, M) del cane (**Tabella 15**).

Tabella 15. Sanità/infezione vs sesso.

status	F	M	Totale
sano	698	539	1.237
infetto	47	56	103
Totale	745	595	1.34

Prevalenza media annuale 2006-2013

I valori della prevalenza media annuale hanno mostrato un minimo di 7,2% nel 2010 ad un massimo di 16,0% nel 2011 (**Tabella 16**).

Tabella 16. Prevalenza media annuale 2006-2013.

Anno	Prevalenza
2006	13,503
2007	12,569
2008	12,042
2009	8,261
2010	7,278
2011	16,013
2012	9,086
2013	8,616

La prevalenza ha dimostrato un trend non lineare ($p=0.728$) (**Figura 23**).

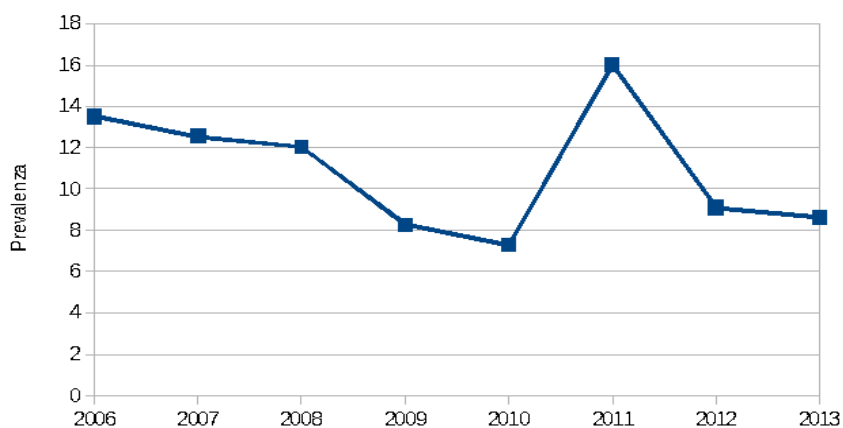


Figura 23. Trend della prevalenza media annuale della provincia di Rieti (2006-2013).

2. PRESENZA E DIFFUSIONE DI LV ED LC

Le tabelle mostrano i dati del Ministero della Salute e dell'ASP sui casi di leishmaniosi nell'uomo nel periodo 2000-2013 (**Tabelle 17-18**).

Tabella 17. Casi di leishmaniosi viscerale notificati nel periodo di studio (Ministero della Salute).

Anno	Prov	Malattia	Classi età					
			0-14		14-64		>= 65	
			M	F	M	F	M	F
2000	RI	LV	0	0	0	0	0	1
2005	RI	LV	0	0	1	0	0	0
2006	RI	LV	0	0	1	0	0	0
Tot	3							

Tabella 18. Casi di leishmaniosi viscerale notificati nel periodo di studio (ASP).

Anno Notifica	Asl residenza	Comune residenza	Sede Ricovero	Eta'	Sesso	Nazionalita'
2000	RI	Fara in Sabina	Rieti	76	F	Italiana
2001	RI	Rieti	Roma	38	M	Italiana
2005	RI	Fara in Sabina	Rieti	42	M	Italiana
2007	RI	Forano	Rieti	57	M	Italiana
2009	RI	Forano	Roma	58	M	Italiana
2009	RI	Casaprota	Roma	2	F	Italiana

Confrontando le due fonti possiamo notare una discrepanza nel numero di casi (3 Ministero della Salute e 6 ASP). Analizzando i casi dell'ASP possiamo notare come tutti e i casi siano di LV e tutti i pazienti siano di cittadinanza italiana. Il caso riportato

nel 2009 a Forano si è rivelata essere una recidiva come si evince confrontando i dati anagrafici con quelli del caso del 2007. 3 pazienti (60%) sono adulti (14-64), 1 (20%) in età pediatrica (0-14), 1 (20%) anziano (≥ 65). 3 pazienti (60%) sono di sesso maschile e 2 (40%) di sesso femminile. Il ricovero è avvenuto a Rieti in 3 casi (60%) e a Roma in 2 casi. Il paziente che ha presentato la recidiva, è stato ospedalizzato a Rieti la prima volta, ed a Roma in occasione della stessa. Valutando la distribuzione dei casi sul territorio provinciale 1 caso è stato registrato nel distretto sanitario di Montepiano Reatino (Rieti), 1 caso nel Mirtense e 3 casi nel Salario-Turano.

3. MONITORAGGIO DEI FLEBOTOMI

3.1 Prevalenza delle specie identificate nell'area di studio

Durante il periodo di studio sono stati raccolti un totale di 831 esemplari di flebotomi (di cui 62,2% maschi) risultati appartenere a due generi (Phlebotomus e Sergentomya). Le specie identificate sono state quattro: *P. perniciosus* (6,4 %), *P. perfiliewi* (1,8%), *P. mascittii* (0,1%) e *S. minuta* (91,7 %) (**Tabella 19**).

Tabella 19. Prevalenza delle specie e numero esemplari nei siti monitorati negli anni 2011 e 2012.

No. sito	Località	No esemplari (MM)	<i>P.perniciosus</i> (MM)	<i>P.perfliewi</i> (MM)	<i>P. mascittii</i> (MM)	<i>S. minuta</i> (MM)
2011						
1	Sigillo	3 (1)	2	0	1 (1)	0
2	Posta	3 (0)	3 (0)	0	0	0
3	Terzone	0	0	0	0	0
<i>Total e</i>		6 (1)	5 (0)	0	1 (1)	0
2012						
4	Talocci	524 (335)	17 (16)	2 (1)	0	505 (318)
5	Rionasso	26 (7)	2 (1)	13 (3)	0	11 (3)
6	Piana di Rieti	275 (174)	29 (29)	0	0	246 (145)
<i>Total e</i>		825 (516)	48 (46)	15 (4)	0	762 (466)
<i>Tot 2011-2012</i>		831 (517)	53 (46)	15 (4)	1 (1)	762(466)
TOTALE (%)		831 (62,2)	53 (6,4%)	15 (1,8%)	1 (0,1%)	762 (91,7%)

3.2 Altitudine

I flebotomi sono stati trovati alle quote monitorate (120, 200, 398, 600, 800, 1100 m s.l.m), fino agli 800 m. La stazione a 1100 m è sempre risultata negativa.

3.3 Sex Ratio

La sex ratio (M/F) complessiva è risultata a favore dei maschi 517/314 (1:0,6). Nei siti di Talocci e Piana di Rieti il rapporto si è confermato a favore dei maschi (1:0,6), mentre nei siti di Sigillo, Posta e Rionasso è risultata a favore delle femmine (**Tabella 20**).

Tabella 20. Sex ratio (M/F) dei flebotomi ottenuti nei siti monitorati negli anni 2011 e 2012.

	Sigillo		Posta		Terzone		Talocci		Rionasso		Piana di Rieti		Tot	
Sesso	n	M/F	n	M/F	n	M/F	n	M/F	n	M/F	n	M/F	n	M/F
M	1		0		0		335		7		174		517	
		1:2		0:3		0		1:0,6		1:2,7		1:0,6		1:0,6
F	2		3		0		189		19		101		314	
Tot	3		3		0		524		26		275		831	

3.4 Metodo di cattura

In tabella (**Tabella 21**) sono riportati i risultati delle catture del 2012 dove sono stati utilizzati due metodi di cattura in parallelo. Su un totale di 825 esemplari di flebotomi, 783 (94,9%) sono stati raccolti con le trappole adesive e solo 42 esemplari (5,1%) con la trappola luminosa. Le trappole adesive hanno catturato il maggior numero di esemplari in totale e nei siti di Talocci e Piana di Rieti. La differenza risulta statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabella 21. Numero di flebotomi ottenuti mediante la trappole a luce e le trappole adesive nei tre siti monitorati nel 2012.

Metodo	Talocci		Rionasso		Piana di Rieti		<i>N Totale</i>
	n	%	n	%	n	%	
Trappola a luce	22	4,2	17	65,4	3	1,1	42 (5,1%)
Trappole adesive	502	95,8	9	34,6	272	98,9	783 (94,9%)
<i>Totale</i>	524		26		275		825

3.5 Metodo di cattura e Sex Ratio

In tabella sono (**Tabella 22**) riportati i risultati relativi al numero di flebotomi maschi e femmine ottenuti mediante la trappola a luce e le trappole adesive nel 2012. Entrambi i tipi di trappola hanno catturato più maschi nei siti di Talocci e Piana di Rieti, mentre nel sito di Rionasso hanno catturato più femmine (Tabella XXX). La differenza risulta statisticamente significativa ($p < 0,001$).

Tabella 22. Numero di flebotomi maschi e femmine ottenuti mediante la trappola a luce e le trappole adesive nei tre siti monitorati nel 2012.

Metodo	Talocci		Rionasso		Piana di Rieti		<i>Tot</i>
	M (%)	F (%)	M (%)	F (%)	M (%)	F (%)	
Trappola a luce	16 (4,8)	6 (3,2)	5 (71,4)	12 (63,2)	3 (1,7)	0 (0)	42 (5,1)
Trappole adesive	319 (95,2)	183 (96,8)	2 (28,6)	7 (36,8)	171 (98,3)	101 (100)	783 (94,9)
<i>Tot M F</i>	335	189	7	19	174	101	

<i>Tot</i>	524	26	275	825
------------	-----	----	-----	-----

3.6 Metodo di cattura e specie

In tabella sono riportati (**Tabella 23**) i risultati relativi al numero di esemplari delle diverse specie di flebotomo ottenuti mediante la trappole a luce e le trappole adesive nel 2012. Le trappole adesive hanno catturato il maggior numero di *S. minuta* (97,9%) e *P. perniciosus* (74,5%), mentre la trappola luminosa ha catturato il maggior numero di *P. perfliewi* (93,3%).

Tabella 23. Numero di esemplari delle diverse specie di flebotomo ottenuti mediante la trappola a luce e trappole adesive nei tre siti monitorati nel 2012.

Metodo	<i>S. minuta</i>	<i>P.perniciosus</i>	<i>P.perfliewi</i>	Tot Phlebotominae
Trappola a luce	16 (2,1)	19 (39,6)	14 (93,3)	42 (5,1)
Trappole adesive	746 (97,9)	29 (60,4)	1 (6,6)	783 (94,9)
<i>Tot</i>	762	48	15	825

3.7 Densità

Al fine di confrontare i risultati dei tre siti monitorati nell'anno 2012 è stata calcolata la densità (N/m²) di *Phlebotomus* spp. e delle Phlebotominae dividendo il numero di esemplari ottenuti per i metri quadri di sticky traps utilizzati in ciascuna cattura (**Tabelle 24-26**). I valori di densità ottenuti sono stati inseriti in un grafico per valutarne l'andamento durante la stagione di cattura (**Figure 24-26**).

La densità (N/m²) di *Phlebotomus* spp. ha in generale assunto valori compresi tra 0 e 12,2 con una media di 1,33 mentre quella delle Phlebotominae è arrivata fino a 238,3 (densità media: 55,8). Il sito di Piana di Rieti si è dimostrato essere il più ricco dei tre in *Phlebotomus* spp. (0-12,2; densità media: 2,3), mentre Talocci è risultato il sito con la più alta densità di Phlebotominae, quindi in *S. minuta* (0-238,3; densità media 139,4). Nel sito di Rionasso sono state registrate densità più basse di sia di *Phlebotomus* spp (0-1,6; densità media 0,3) che di Phlebotominae in generale (0-8,3; densità media 1,9). In tutti e tre i siti in ogni caso la specie con le maggiori densità è risultata *S. minuta*.

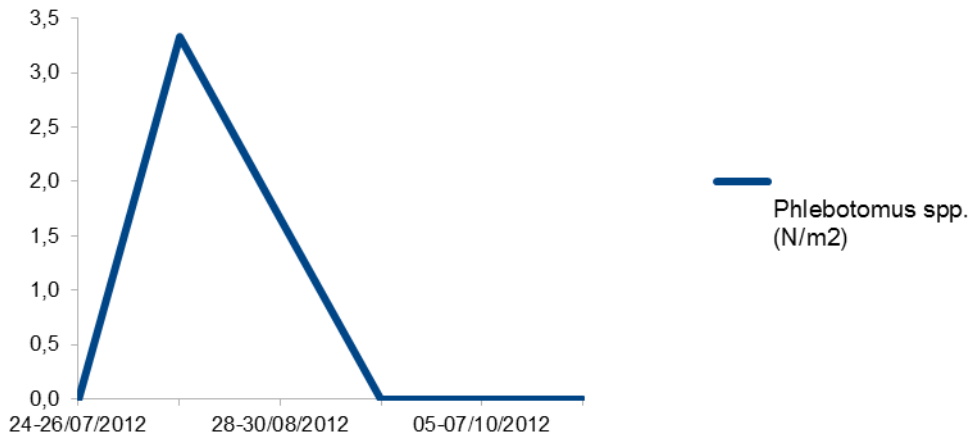
3.7.1 Talocci

Tabella 24. Densità di *Phlebotomus* spp, Phlebotominae ed intensità di cattura applicata nel sito di Talocci nella stagione di cattura 2012.

Data	N <i>Phlebotomus</i> spp.	N Phlebotominae	N sticky (1=0.04 m ²)	m ² *	Densità <i>Phlebotomus</i> spp. (N/m ²)	Densità Phlebotominae (N/m ²)
24-26/07	0	123	15	0,6	0	205
08/10/08	2	115	15	0,6	3,3	191,7
28-30/08	1	143	15	0,6	1,7	238,3
19-21/09	0	81	15	0,6	0	135
05/07/10	0	40	15	0,6	0	66,7
19-21/10	0	0	15	0,6	0	0
Totale	3	502	90	3,6	0,8	139,4

* m² di sticky traps utilizzati (Intensità di cattura)

Talocci



Talocci

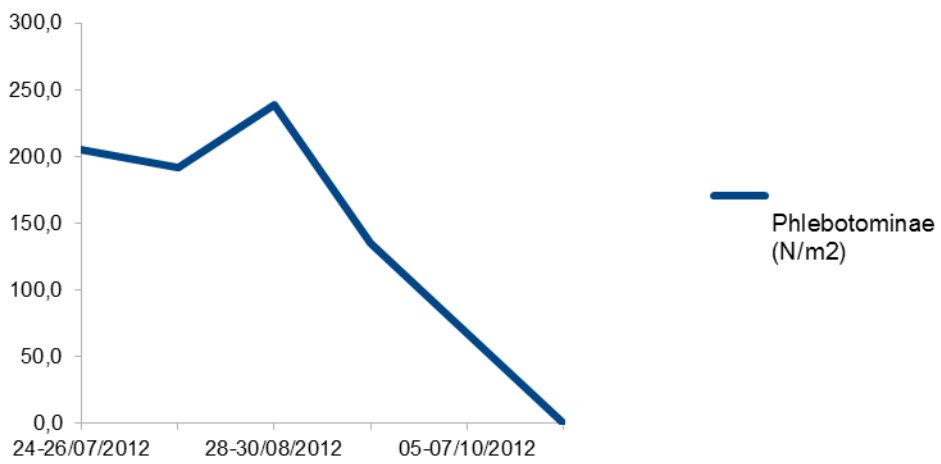


Figura 24. Densità e dinamica stagionale di *Phlebotomus* spp. e Phlebotominae.

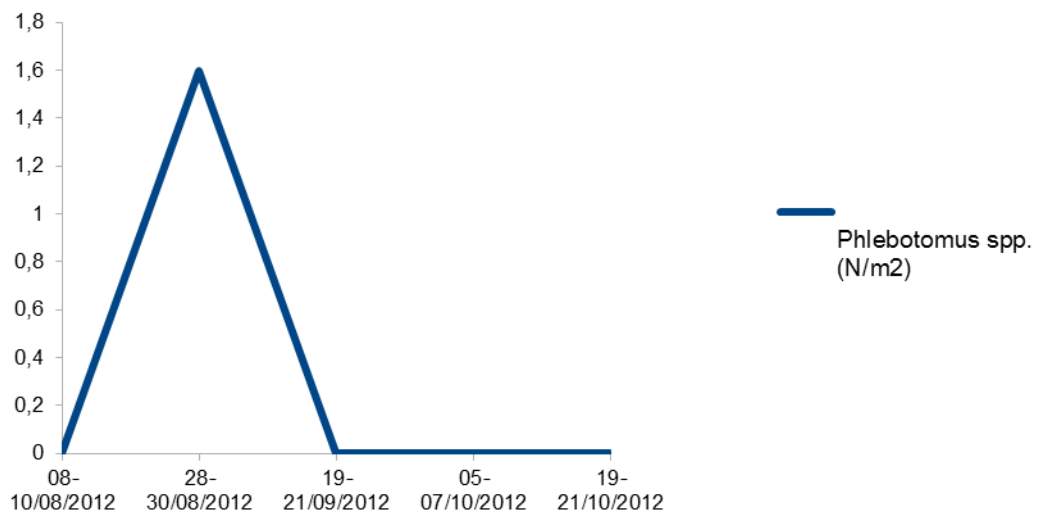
3.7.2 Rionasso

Tabella 25. Densità di *Phlebotomus* spp, Phlebotominae ed intensità di cattura applicata nel sito di Rionasso nella stagione di cattura 2012.

Data	N <i>Phlebotomus</i> spp.	N Phlebotominae	N sticky (1=0.04 m2)	m2*	Densità <i>Phlebotomus</i> spp. (N/m2)	Densità Phlebotominae (N/m2)
24-26/07	-	-	-	-	-	-
08/10/08	0	1	13	0,5	0	2
28-30/08	1	3	16	0,6	1,6	4,7
19-21/09	0	5	15	0,6	0	8,3
05/07/10	0	0	13	0,5	0	0
19-21/10	0	0	13	0,5	0	0
Totale	1	9	70	3,1	0,3	2,9

*m2 di sticky traps utilizzati (Intensità di cattura)

Rionasso



Rionasso

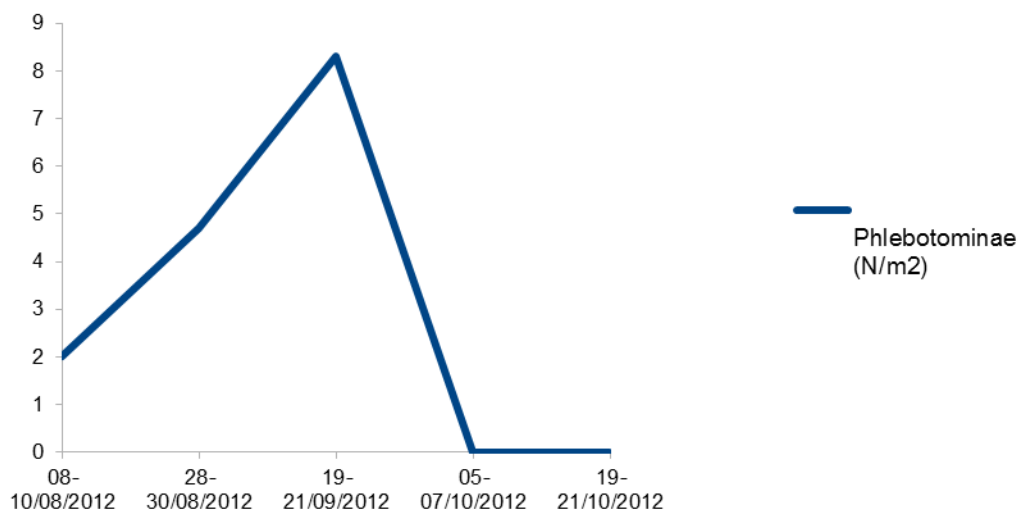


Figura 25. Densità e dinamica stagionale di *Phlebotomus* spp. e Phlebotominae.

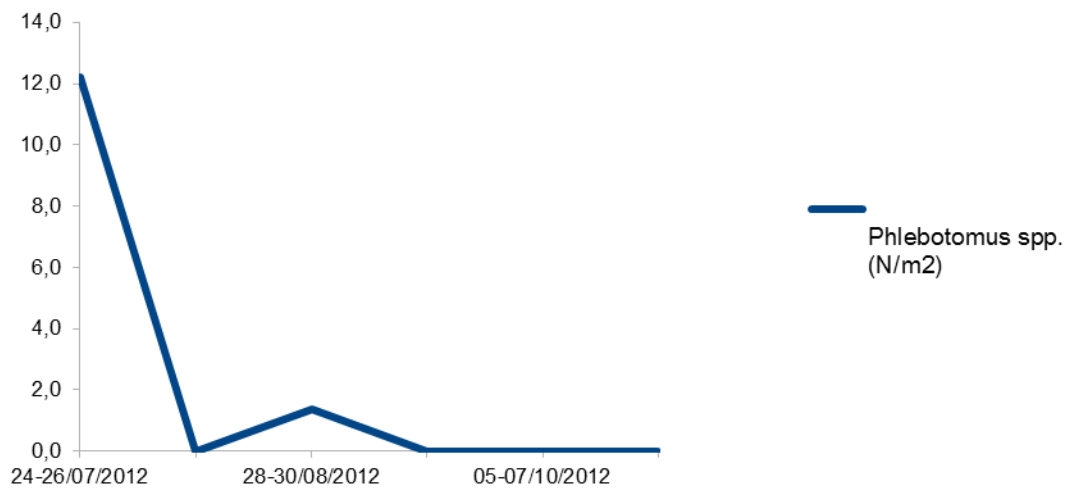
3.7.3 Piana di Rieti

Tabella 26. Densità di *Phlebotomus* spp, Phlebotominae ed intensità di cattura applicata nel sito di Piana di Rieti nella stagione di cattura 2012.

Data	N <i>Phlebotomus</i> spp.	N Phlebotominae	N sticky (1=0.04 m2)	m2*	Densità <i>Phlebotomus</i> spp. (N/m2)	Densità Phlebotominae (N/m2)
24-26/07	22	128	45	1,8	12,2	71,1
08/10/08	0	69	45	1,8	0	38,3
28-30/08	3	74	55	2,2	1,4	33,6
19-21/09	0	1	35	1,4	0	0,7
05/07/10	0	0	45	1,8	0	0
19-21/10	0	0	45	1,8	0	0
Totale	25	272	270	10,8	2,3	25,2

*m2 di sticky traps utilizzati (Intensità di cattura)

Piana di Rieti



Piana di Rieti

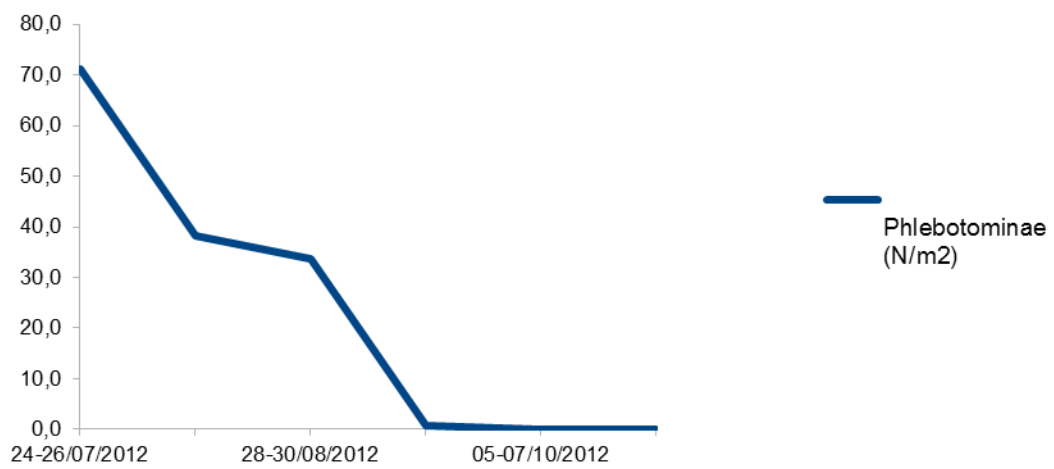


Figura 26. Densità e dinamica stagionale di *Phlebotomus* spp. e Phlebotominae.

3.8 Dinamica di stagionale

Anche se la valutazione della dinamica stagionale non può essere completa dato che il monitoraggio è cominciato nel mese di Luglio e non è partito quindi da un'assenza di flebotomi possiamo comunque osservare come il numero massimo di esemplari sia stato raccolto a fine Luglio e fine Agosto.

La dinamica stagionale di *Phlebotomus* spp. e Phlebotominae, comprensiva dei tre siti monitorati nel 2012, è mostrata in figura (**Figure 27-28**).

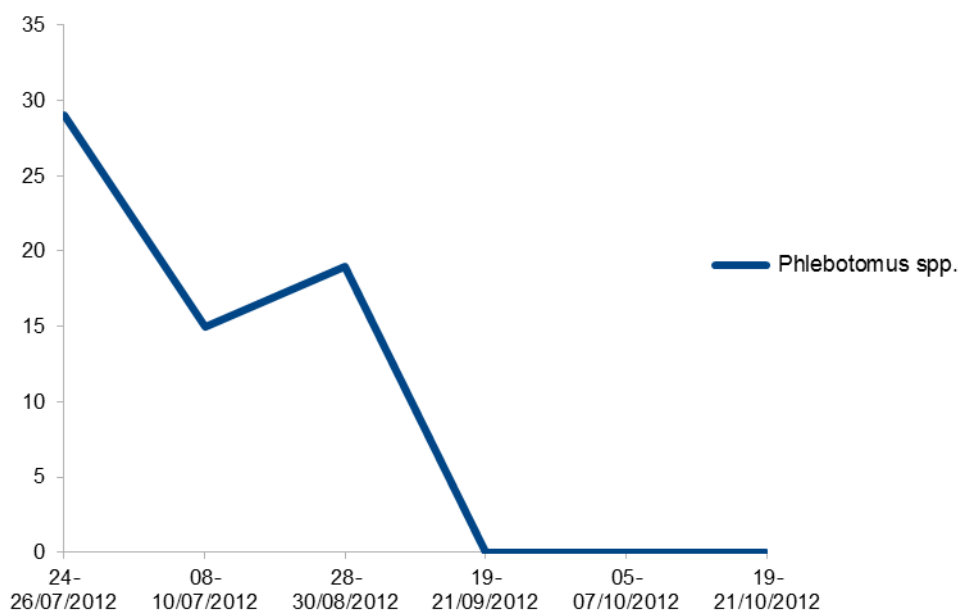


Figura 27. Dinamica stagionale di *Phlebotomus* spp. nei siti monitorati nel 2012.

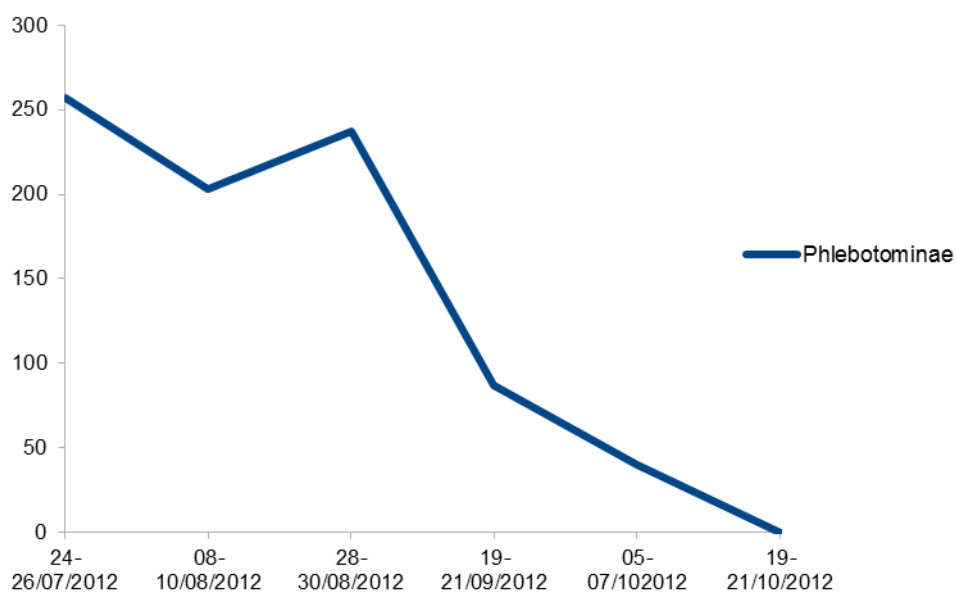


Figura 28. Dinamica di stagionale delle Phlebotominae nei siti monitorati nel 2012.

3.8.1 Dinamica stagionale e temperatura

Dalle analisi delle correlazioni tra il numero di flebotomi (*Phlebotomus* spp e Phlebotominae) e alcune delle possibili variabili ambientali che potenzialmente potevano influire sui risultati delle catture, è stata trovata una correlazione diretta significativa con la temperatura media Tmed (°C). In particolare all'aumentare della temperatura aumenta il numero di *Phlebotomus* spp ($r=0,73$, $p<0,001$) e di Phlebotominae ($r=0,69$, $p<0,001$) e ciò risulta vero a partire dai 20°C (**Figura 29**).

Dinamica stagionale delle Phlebotominae e Tmed

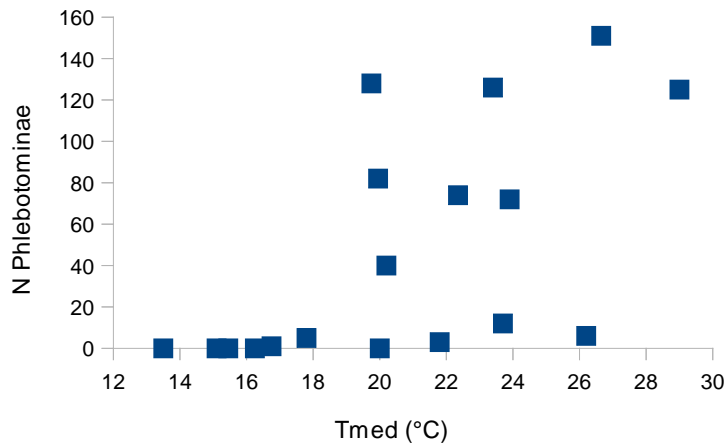


Figura 29. Dinamica stagionale delle Phlebotominae e Tmed (°C).

3.8.2 Dinamica stagionale e umidità

E' stata evidenziata una correlazione inversa significativa tra il numero di *Phlebotomus* spp ($r = -0,56$, $p < 0,05$) e di Phlebotominae ($r = -0,51$, $p < 0,05$) ed il livello di umidità medio (Umed %). All'aumentare del livello di umidità diminuisce il numero di esemplari catturati (**Figura 30**).

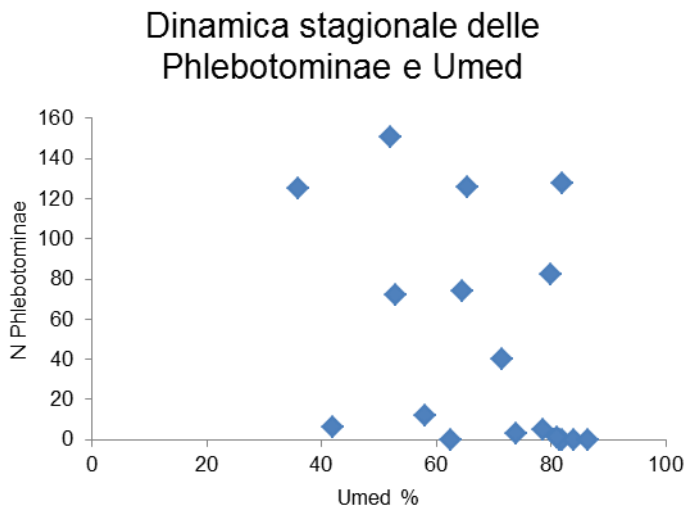


Figura 30. Dinamica stagionale delle Phlebotominae e Umed (%).

3.8.3 Dinamica stagionale e precipitazioni

Nessuna correlazione significativa è stata rilevata tra quantità di precipitazioni (mm) e numero di flebotomi (*Phlebotomus* spp $r = -0,26$ $p = 0,3043$; Phlebotominae $r = -0,04$ $p = 0,8837$).

4. RICERCA DI LEISHMANIA SPP. NEI FLEBOTOMI MEDIANTE PCR

4.1 Metodi di estrazione

I risultati del controllo interno di estrazione dei primi 77 campioni estratti per bollitura sono riassunti in tabella (**Tabella 27**).

Tabella 27. 18S rRNA PCR (controllo interno di estrazione).

18S rRNA PCR	Bollitura	
	n. campioni	%
Neg	35	46
Deb pos	8	10
Pos	34	44
Totale	77	100

I campioni negativi (n 35) o debolmente positivi (n 8) sono stati riestratti mediante kit commerciale e ritestati in PCR fornendo i risultati riportati in tabella (**Tabella 28**).

Tabella 28. Esiti dei campioni negativi al 18S rRNA PCR (controllo interno di estrazione) riestratti con kit commerciale.

18s rRNA PCR	Kit	
	n. campioni	%
Neg	15	35
Deb pos	4	9
Pos	24	56
Totale	43	100

In considerazione del fatto che campioni precedentemente estratti per bollitura e risultati negativi al controllo interno sono in seguito risultati positivi dopo estrazione con il kit,

si è deciso di continuare l'estrazione dei restanti campioni utilizzando esclusivamente il kit commerciale.

La tabella (**Tabella 29**) confronta i risultati del controllo interno di estrazione (18S rRNA PCR) nei campioni estratti mediante bollitura ed i campioni estratti esclusivamente con il kit.

Tabella 29. Controllo interno di estrazione (18S rRNA PCR): confronto dell'estrazione per bollitura e con il kit commerciale.

18s rRNA PCR	Kit		Bollitura	
	n. campioni	%	n. campioni	%
Neg	26	16	35	46
Deb pos	33	21	8	10
Pos	102	63	34	44
Totale	161	100	77	100

4.2 18S rRNA PCR

La figura 31 mostra gli esiti del controllo interno di estrazione dei flebotomi.

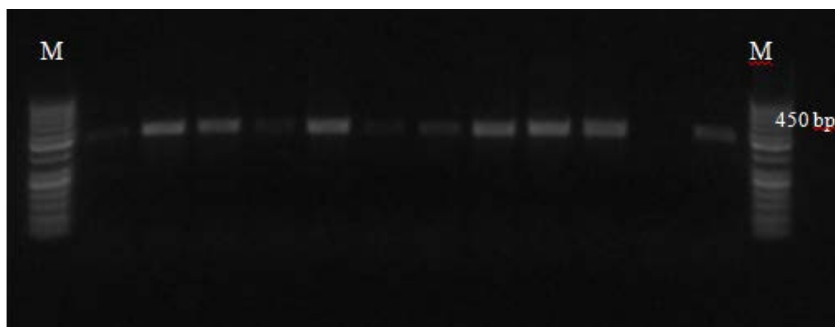


Figura 31. 18S rRNA PCR.

4.3 16S nPCR

Tutti gli esemplari di *Phlebotomus* spp. (n. 13) sono risultati negativi alla nPCR per *Leishmania* spp. Alcuni campioni di *Sergentomya minuta* analizzati (n. 14) costituiti da 6 pools e 8 campioni singoli sono risultati positivi per *Leishmania* spp. La positività in PCR si aggira tra 4,8-8,9% (14-26/292) a seconda del numero di insetti positivi all'interno dei pools.

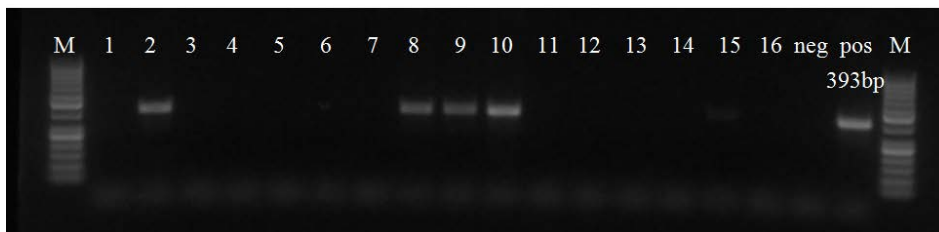


Figura 32. 16S rDNA nPCR.

4.4 ITS1 nPCR-RFLP

I campioni risultati positivi venivano analizzati mediante ITS1 nPCR per determinare la specie del parassita. 12 su 14 campioni mostravano una banda di circa 300 bp. (**Figura 33**).

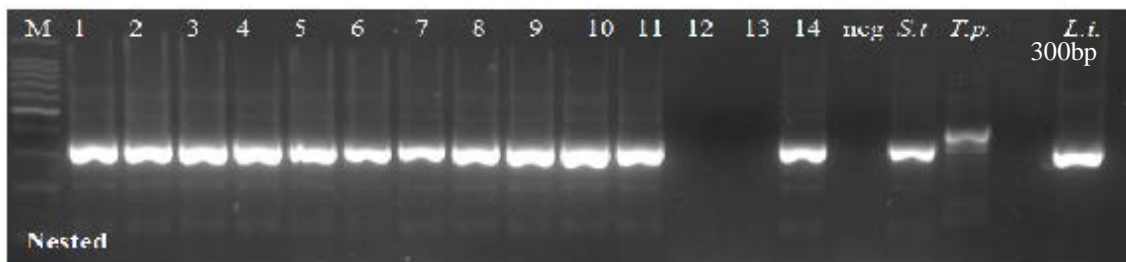
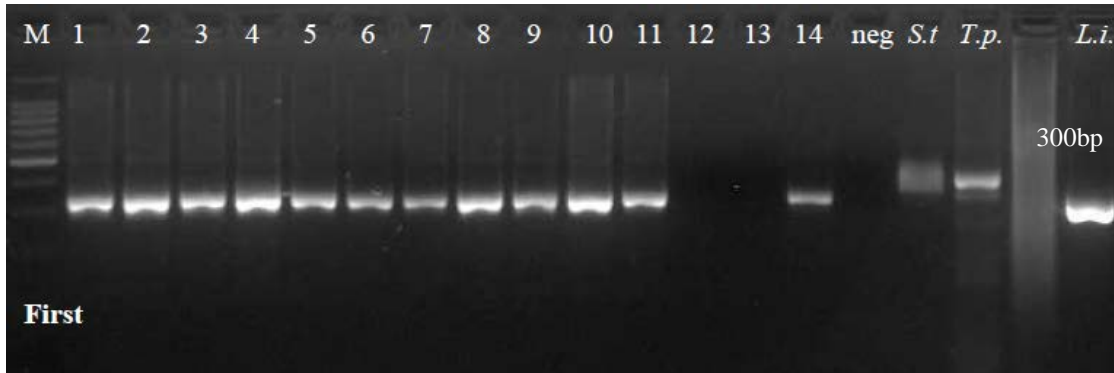


Figura 33. ITS1 nPCR. *S.t.*=*Sauroleishmania tarentolae* (RTAR/FR/78/LEM124) *T.p.*=*Trypanosoma platydictyli* (IMIN/IT/87/ISST15); *L.i.*=*L. infantum* ZMON-1 (MHOM/TN/80/IPT1).

L'analisi dei patterns di restrizione mostrava un profilo compatibile con quello del ceppo di riferimento di *Sauroleishmania tarentolae* (RTAR/FR/78/LEM124) (**Figura 34**).

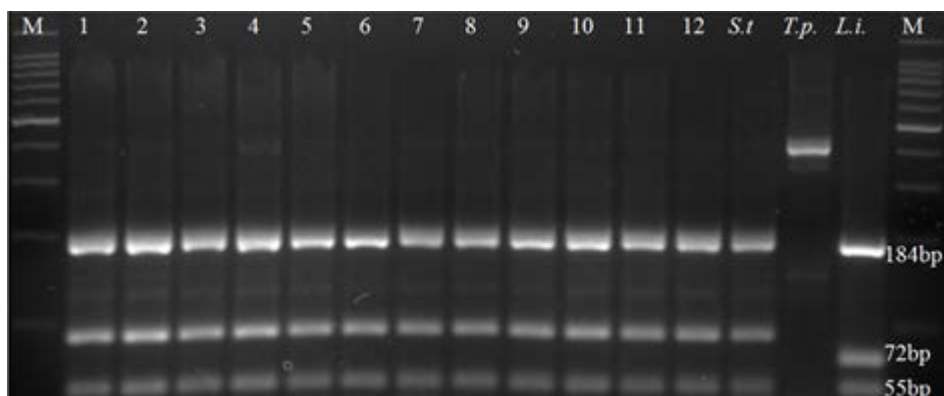


Figura 34. Profilo di restrizione con *HaeIII*. *S.t.*=*Sauroleishmania tarentolae* (RTAR/FR/78/LEM124) *T.p.*=*Trypanosoma platydictyli* (IMIN/IT/87/ISST15); *L.i.*=*L. infantum* ZMON-1 (MHOM/TN/80/IPT1).

1. DISCUSSIONE

1.1 PRESENZA E DIFFUSIONE DI LCan

Nel periodo 2006-2013 la sieroprevalenza grezza per LCan nei comuni è risultata compresa tra 0-76,9%. Non riteniamo che questo dato corrisponda alla situazione reale, costituisce tuttavia l'unico dato ufficiale disponibile. Riteniamo che dati più indicativi della situazione epidemiologica siano quelli calcolati in comuni come quello di Rieti (0-7,6%) nei quali c'è stata un'adeguata numerosità campionaria nel periodo di studio. Su questo dataset non è stata rilevata, come prevedibile, alcuna correlazione tra sieroprevalenza e fattori climatico-ambientali quali altitudine, temperatura e copertura del suolo. In molti dei 31 comuni analizzati, infatti, la numerosità campionaria è risultata esigua e ciò ha determinato una sovrastima della prevalenza. Ciò risulta particolarmente evidente in alcuni comuni localizzati in zone montuose o meno urbanizzate dove è verosimile che la sensibilità nei confronti della prevenzione e dei test di screening sia più scarsa ed i pochi campioni pervenuti siano stati inviati su sospetto clinico. Al contrario, in zone quali il comune di Rieti, sede di un canile comunale fino a Gennaio 2011, i dati di sieroprevalenza sembrano essere più veritieri. La mancanza di relazione con i fattori ambientali, che avremmo atteso, potrebbe essere anche giustificata, in minima parte, con la parziale non autoctonia dei casi dovuta agli spostamenti della popolazione canina per viaggi e vacanze con i proprietari. Altro fattore da tenere in considerazione è l'orografia della provincia; infatti nelle zone montuose, che rappresentano il 70% del territorio, la popolazione canina presenta densità molto basse. Sono state trovate differenze significative tra infezione, età e razza. In particolare è stato notato che gli infetti risultano essere più vecchi rispetto ai sani. Alcuni autori hanno descritto un picco bimodale nella prevalenza di leishmania (2-4 anni e >7) (Miranda et al., 2008) che in questo studio non è stato rilevato. In relazione alla razza abbiamo notato che tra i sani il rapporto tra cani meticci/di razza è significativamente più alto che tra gli infetti. E' stato inoltre notato che all'aumentare del titolo IFI aumenta la percentuale di cani di razza e diminuisce quella dei meticci. Alcune razze sembrano infatti essere più predisposte a sviluppare sintomatologia clinica (Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e Pastore Tedesco) mentre i meticci provenienti da aree endemiche o alcune razze come l'IBizian hound mostrano la malattia con minor

frequenza in virtù di una più efficace immunità cellulo mediata (Solano-Gallego et al., 2000; Miranda et al., 2008; Saridomichelakis, 2009). La predisposizione relativa al sesso, con maggior suscettibilità dei soggetti di sesso maschile rilevata da alcuni autori (Miranda et al., 2008) è risultata ai limiti della significatività nel nostro caso. Valutando l'andamento della prevalenza media annuale (2006-2013) è stato osservato un trend non lineare: in particolare si può notare un picco tra il 2010 ed il 2011 seguito da una brusca diminuzione nel 2012. Il picco 2010-2011 potrebbe essere spiegato con un aumento delle segnalazioni in seguito all'entrata in vigore della DGR. 473/2010 più che con un reale aumento dell'endemia. Il decremento successivo è presumibilmente spiegato dalla chiusura del canile comunale di Rieti seguito dallo spostamento degli animali in altre strutture e la conseguente diminuzione dei campioni diagnostici inviati all'IZSLT.

1.2 PRESENZA E DIFFUSIONE DI LV ED LC

La leishmaniosi umana è risultata essere sporadica ma stabile nel territorio provinciale. Dal 2000 al 2013 sono stati registrati 6 casi sparsi, tra i quali una recidiva, tutti della forma viscerale (LV) che hanno interessato prevalentemente soggetti adulti di sesso maschile, nazionalità italiana e residenti nella provincia di Rieti. Il sospetto di autoctonia dei casi è forte. Non abbiamo avuto notizie circa la presenza di coinfezioni da HIV. I casi hanno interessato pazienti residenti nel basso reatino (Salario-Turano, Mirtense) e nel comune di Rieti. Analizzando i dati forniti dalle due fonti consultate abbiamo notato alcune discrepanze relative al numero di casi notificati. In particolare il Ministero della Salute riporta un numero inferiore di casi rispetto all'ASP e talvolta anno di notifica differente. Tali rilievi potrebbero essere spiegati con un diverso criterio di notifica adottato dai due enti: sede di ricovero per il Ministero della Salute e comune di residenza/domicilio per l'ASP. La segnalazione dei casi per sede di ricovero determina una sottostima dei casi nelle province in cui non sono presenti strutture Ospedaliere con reparti di malattie infettive idonei alla diagnosi della leishmaniosi ed a una sovrastima nelle grandi città, quali ad esempio Roma, nella nostra regione.

1.3 MONITORAGGIO DEI FLEBOTOMI

E' stata rilevata la presenza dei flebotomi in 5 dei 6 siti monitorati. Sono state rilevate 4 (50%) delle 8 specie presenti in Italia. La specie più numerosa è risultata *S. minuta*

seguita da *P. perniciosus*, *P. perfliewi* e *P. mascittii* (**Figura 35**). Il limite altitudinale del flebotomo si è attestato intorno agli 800 m s.l.m.

Flebotomi catturati nella provincia di Rieti 2011-2012

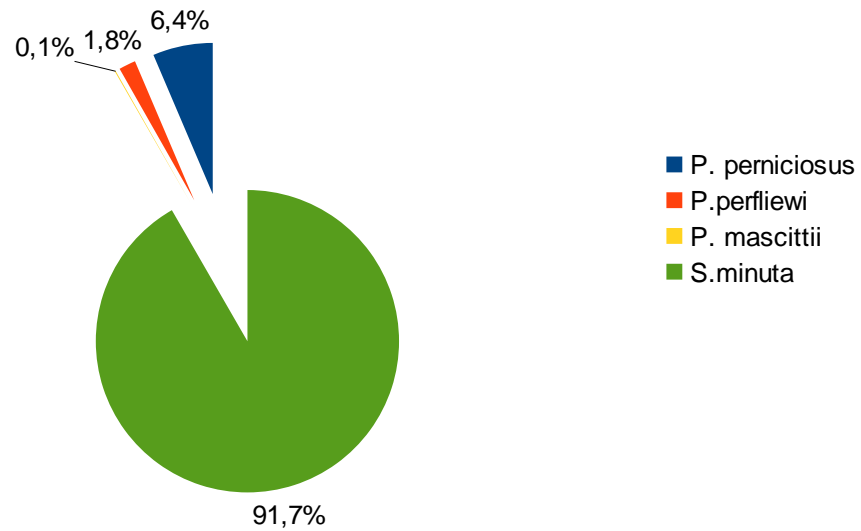


Figura 35. Prevalenza delle specie.

La sex ratio è risultata a favore dei maschi come riportato da altri autori (Signorini et al., 2013; Samy et al., 2014).

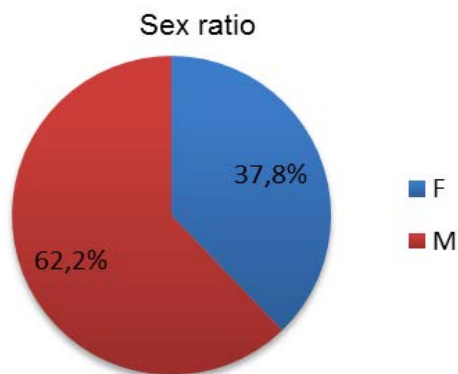


Figura 36. Sex ratio

Per quanto riguarda i metodi di cattura è stato osservato che in generale le trappole adesive hanno catturato un numero di esemplari più alto (94,9%) delle luminose (**Figura 36**) e la differenza risulta statisticamente significativa ($p < 0,05$). Nella valutazione di questo dato c'è però da considerare il fatto che la totalità degli esemplari catturati con le ST è stato catturato nelle fessure dei barbacani e che le ST presenti nei ricoveri accanto alle OND sono risultate sempre negative in tutti i siti. Inoltre la maggioranza degli esemplari catturati è risultata essere *S. minuta* flebotomo che si nutre prevalentemente su rettili e cerca ricovero nelle fessure dei muri. *P. perfliewi* è stato catturato principalmente attraverso le trappole luminose (93,3%) e ciò potrebbe essere dovuto all'elevato fototropismo positivo di questa specie (Romi et al., 2012, Dantas-Torres et al., 2014). *P. perniciosus* è stato catturato prevalentemente con ST (60,4%).

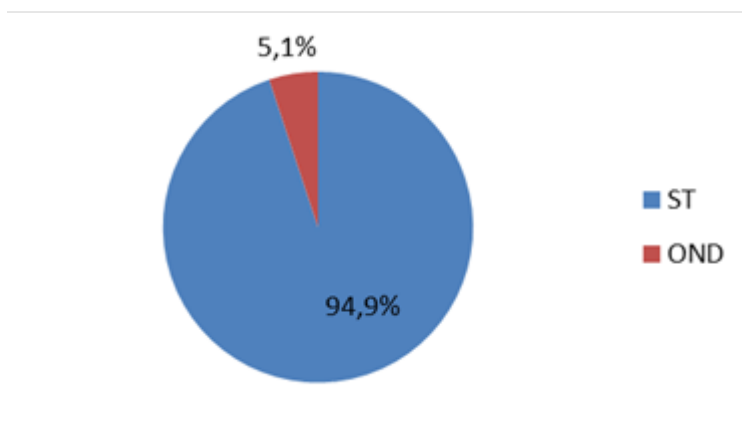


Figura 36. Metodo di cattura. ST=Sticky Traps; OND=Onderstepoort.

La densità media di *Phlebotomus* spp (N/m²), vettore di leishmaniosi, è risultata bassa (1,33) in tutti e tre i siti monitorati nel 2012 mentre quella delle Phlebotominae è risultata alta (55,8) secondo gli indici del WHO (WHO, 1979) (densità bassa: < 8 flebotomi/m²; densità media: tra 8-32 flebotomi/m²; densità alta: > 32 flebotomi/m). Valutando la dinamica stagionale dei flebotomi nel periodo di studio possiamo notare che le numerosità maggiori sono state registrate a fine Luglio e fine Agosto.

Analizzando la relazione tra dinamica stagionale, temperatura (Tmed°C) ed umidità (Umed%) sono state notate relazioni statisticamente significative: il numero di flebotomi aumenta all'aumentare della temperatura ed al diminuire dell'umidità in linea con quanto descritto da altri autori (Dantas-Torres et al., 2014).

1.4 RICERCA DI *LEISHMANIA* SPP. NEI FLEBOTOMI MEDIANTE PCR

Valutando in prima istanza i metodi di estrazione utilizzati possiamo concludere che il metodo mediante alte temperature (bollitura) seppur caratterizzato da economicità e semplicità, è risultato meno efficace del 20% rispetto al kit commerciale nell'estrazione degli acidi nucleici. Il controllo interno di estrazione (18s rRNA) messo a punto si è rivelato un valido aiuto per valutare la procedura di estrazione ed interpretare i successivi esiti, permettendoci di riestrarre alcuni campioni che hanno in seguito dato esito positivo per *Leishmania* spp. Per quanto riguarda la 16S nPCR tutti gli esemplari di *Phlebotomus* spp. sono risultati negativi, mentre il 4,8% (14/292) delle *S. minuta* sono risultati positivi. Tramite ITS1 PCR-RFLP i campioni sono stati tipizzati come *Sauroleishmania tarentolae*. Il genere *Sauroleishmania* fa parte della Famiglia Trypanosomatidae insieme al genere *Leishmania* con il quale presenta un altissimo grado di similarità all'analisi delle sequenze dello spaziatore esterno trascritto (ETS) (Orlando et al., 2002). Recentemente con il sequenziamento di nuova generazione l'intero genoma di *S. tarentolae* è stato messo a confronto con quello di leishmanie di interesse medico (*L. infantum*, *L. major*, *L. brasiliensis*) confermando un'identità del 90% e rivelando la perdita da parte di *S. tarentolae* di alcuni geni coinvolti nella patogenesi o espressi preferenzialmente nello stadio intracellulare parassitario delle forme patogene di *Leishmania*. *S. tarentolae* è considerata non patogena per l'uomo anche se è in grado di entrare nei macrofagi umani e differenziarsi in amastigote ma non vi è chiara evidenza di una sua attiva replicazione all'interno di essi. E' parassita di gechi e lucertole dove si localizza nella cloaca, nell'intestino o nel torrente circolatorio e viene trasmessa attraverso vettori (*S.minuta*). Raramente sono stati osservati amastigoti di *S. tarentolae* liberi o all'interno dei monociti di rettili. (Raymond et al., 2012). Il rilievo di *S.tarentolae* in *S. minuta* ci dimostra come questo parassita sia diffuso nelle popolazioni di rettili locali e, a nostro avviso, data l'estrema identità

genetica con *L. infantum*, potrebbe costituire un indicatore di idoneità alla sua presenza nelle zone monitorate. Inoltre, il recente rilievo di DNA di *S. tarentolae*, con il 100% di similarità con l'attuale ceppo di riferimento, nei tessuti di una mummia di 300 anni comprova la sua capacità di visceralizzazione e replicazione in organismi a sangue caldo sollevando dubbi sulla patogenicità passata o presente. Questo rilievo unito alle segnalazioni sulla presenza di *L. major*, *infantum*, *donovani* (Mukherjee et al. 1997, Senghor et al. 2011, Berdjane-Brouk et al. 2012, Campino et al., 2013) in *Sergentomya* richiede chiarimenti sul possibile ruolo vettoriale di questa specie o sulla sua permissività.

CONCLUSIONI

Il presente studio ha permesso di esplorare i diversi aspetti di una malattia zoonotica come la leishmaniosi su scala provinciale. L'approccio multidisciplinare ed integrato utilizzato ha messo in luce punti di forza, punti di debolezza e possibilità di miglioramento di aspetti legati alla sua diagnosi, gestione e comunicazione sul territorio. Per ciò che concerne la LCan il limite più grande riscontrato è la disomogeneità dei dataset sierologico e anagrafico (ACIRL) che determina la distorsione del dato di sieroprevalenza e rende inattendibile la correlazione con altre variabili e l'analisi del rischio. Questo aspetto è di cruciale importanza e riteniamo che ci siano possibilità di miglioramento nel medio-lungo periodo tramite la sensibilizzazione dei proprietari verso la diagnosi precoce, i test di screening e l'iscrizione all'anagrafe da parte di colleghi ASL e libero professionisti. Altro aspetto importante è quello relativo alle segnalazioni dei casi di LCan. Lo sforzo compiuto a livello regionale per regolamentare il flusso dei dati (DGR 473/2010) ha portato ad un aumento delle segnalazioni provenienti dalle ASL nella quasi totalità. Infatti i liberi professionisti rivestono, spesso inconsapevolmente, un ruolo di Sanità Pubblica di primo piano in virtù del loro stretto contatto con i pazienti ed il territorio pertanto le segnalazioni dei casi di LCan dovrebbero costituire, oltre che una pratica burocratica da espletare, un atto dovuto, soprattutto a se stessi, nell'ottica di una Salute Unica (One-Health). La reciproca comunicazione dei casi di leishmaniosi tra servizio medico e medico veterinario, prevista dal Regolamento di Polizia Veterinaria, unita alla diffusione nella popolazione di informazioni sull'incidenza della leishmaniosi umana

sulla presenza e diffusione del vettore costituirebbero il pabulum per un cambiamento. Altra osservazione scaturita da questo lavoro è l'importanza della conoscenza del contesto territoriale per l'interpretazione dei dati epidemiologici e statistici. In questo senso l'ambiente GIS costituisce un validissimo aiuto, se ben interpretato. Analizzando la situazione del dato umano è verosimile che anche nella Provincia di Rieti, come avviene sul territorio nazionale, ci sia un problema di sottotifica in particolar modo per la LC. Inoltre, a nostro avviso, emerge la necessità di armonizzazione tra il dataset centrale (Ministero) e quelli periferici (ASL ed ASP) per quanto riguarda la modalità di notifica (comune di residenza/struttura di ricovero). Inoltre sarebbe importante un sistematico aggiornamento dei dati disponibili on line e la conoscenza del domicilio del paziente per una valutazione epidemiologica più precisa. In relazione ai flebotomi, la loro numerosità è apparsa significativamente influenzata dalla temperatura ed umidità medie come segnalato in altri studi (Dantas-Torres et al., 2014). Riteniamo che le basse densità medie delle specie vettore da noi rilevate nelle zone del basso reatino possano essere dovute alla casualità insita nella scelta dei siti di cattura o nel posizionamento delle trappole piuttosto più che ad una non idoneità ecologica delle zone. Infatti la densità di *S. minuta* si è rilevata molto alta in tutti e tre i siti ed i dati climatici di temperatura ed umidità registrati sembrano essere compatibili con la presenza dei vettori. Valutando gli esiti delle PCR per leishmania effettuate, abbiamo notato come alcuni protocolli dotati di elevata sensibilità possano dare esiti positivi anche in presenza di altri membri della Famiglia Kinetoplastidae come *S. tarentolae* e di ciò deve essere tenuto conto nella diagnostica in campo medico e medico veterinario. In conclusione, alla luce di tutti i limiti sovraesposti, la LCan è risultata comunque presente e diffusa anche con alte prevalenze e con un trend non in diminuzione. La LV ha invece dimostrato un'incidenza sporadica ma stabile in più di 10 anni. I vettori della leishmaniosi sono risultati costantemente presenti, con basse densità, nell'area di studio tra i 120 e gli 800 m s.l.m. Questi rilievi suggeriscono lo stato di endemia della leishmaniosi in una provincia dell'Italia centrale ritenuta poco idonea per il ciclo della malattia.

BIBLIOGRAFIA

Aransay A.M., Scoulica E., Tselentis Y., 2000. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplast DNA. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1933–1938.

Baldelli R., Piva S., Salvatore D., Parigi M., Melloni O., Tamba M., Bellini R. & Poglayen G., 2011. Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel. *Vet Parasitol*, 179, 57-61.

Banuls A.L., Hide M., Prugnolle F., 2007. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv in Parasitology*. 64, 1–109.

Berdjane-Brouk Z, Koné A.K., Djimdé A.A., Charrel R.N., Ravel C., Delaunay P., del Giudice P., Diarra A.Z., Doumbo S., Goita S., Thera M.A., Depaquit J., Marty P., Doumbo O.K., Izri A., 2012. First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia* (*Spelaemyia*) *darlingi* from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. *PLoS ONE* 7:e28266.

Bianciardi P., Brovida C., Valente M., Aresu L., Cavicchioli L., Vischer C., Giroud L., Castagnaro M., 2009. Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. *Toxicol Pathol* 37, 770-775.

Bogdan C., Schonian G., Banuls A. L., Hide M., Pratlong F., Lorenz E., Rollinghoff M., Mertens R., 2001. Visceral leishmaniasis in a german child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 302-306.

Breton M., Tremblay M. J., Ouellette M., and Papadopoulou B., 2005. Live Nonpathogenic Parasitic Vector as a Candidate Vaccine against Visceral Leishmaniasis. *Infect Immun*, 73, 6372–6382.

Campino L., Cortes S., Dionísio L., Neto L., Odete Afonso M., Maia C., 2013. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108, 516-518.

Dantas-Torres F., Tarallo V.D., Latrofa M., Falchic A., Liab R.P., Otranto D., 2014. Ecology of phlebotomine sand flies and *Leishmania infantum* infection in a rural area of southern Italy. *Acta Tropica* 137, 67–73.

Dereure J., Vanwambeke S. O., Malé P., Martinez S., Pratlong F., Balard Y., Dedet J. P. 2009. The Potential Effects of Global Warming on Changes in Canine Leishmaniasis in a Focus outside the Classical Area of the Disease in Southern France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9, 687-694.

da Silva S.M., Amorim I.F.G., Ribeiro R.R., Erly G. Azevedo, Cynthia Demicheli, Maria N. Melo, Wagner L. Tafuri, Nelder F. Gontijo, Marilene S. M. Michalick, Frédéric Frézardc. 2012. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 2858–2867.

Deliberazione della Giunta Regionale, 473/2010. Approvazione delle procedure sanitarie e misure da adottare nei casi sospetti e/o confermati di Leishmaniosi canina nella Regione Lazio. Integrazione delle linee guida allegate alla deliberazione del 21 dicembre 2006 n. 920.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE), Università degli Studi della Tuscia, 2012. Piano faunistico-venatorio della Provincia di Rieti 2013-2018.

Dujiardin J.C., Campino L., Cañavate C., Dedet J.P., Gradoni L., Soteriadou K., Mazeris A., Ozbel Y., Boelaert M., 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*, 14, 1013-18.

Dujardin JC, Van der Auwera G. 2011. Universal Leishmania Species Typing by 4 Markers Volume 52 1103.

EFSA, 2009. Statistical analysis of temporal and spatial trends of zoonotic agents in animals and food. *The EFSA Journal* 253, 1-77.

el Tai N.O., Osman O.F., El Fari M., Presber W., Schönian G., 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94, 575-9.

Enserink, M., "Has leishmaniasis become endemic in the U.S.?". *Science*. 2000; 290: 1881–1883.

Farkas R., Tánzos B., Bongiorno G., Maroli M., Dereure J., 2011. First surveys to investigate the presence of canine leishmaniasis and its phlebotomine vectors in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 11, 823-834.

Ferroglio E., Maroli M., Castaldo S., Trisciuglio A., Raimondo C., Veysendaz E., Saracco M., Rossi L., 2002. Survey of phlebotomine sandflies in North-West Italy. *Parassitologia*, 44, 68.

Fischer D., Thomas S.M., Beierkuhnlein C., 2010. Temperature-derived potential for the establishment of phlebotomine sandflies and visceral leishmaniasis in Germany. *Geospatial Health*, 5, 59-69.

Fraga J., Montalvo A.M., De Doncker S., Dujardin J.C., Van der Auwera G., 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 238–245.

Fraga J., Veland N., Montalvo A.M., Praet N., Boggild A.K., Valencia B.M., Arevalo J., Llanos-Cuentas A., Dujardin J.C., Van der Auwera G. 2012. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 74, 142–150.

Gaglio G., Brianti, E., Napoli E., Falsone L., Dantas-Torres F., Tarallo V.D., Otranto D. Giannetto, S., 2014. Effect of night time-intervals, height of traps and lunarphases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. *Acta Trop.* 133, 73–77.

Garcia L., Kindt A., Bermudez H., Llanos-Cuentas A., De Doncker S., Arévalo J., Quispe Tintaya K.W., Dujardin J.C., 2004, Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCRbased assay targeting heat shock protein 70 genes. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2294–2297.

Gaskin A., Schantz P., Jackson J., Birkenheuer A., Tomlinson L., Gramiccia M., Levy M., Steurer F., Kollmar E., Hegarty B.C., Ahn A., Breitschwerdt. E.B., 2002. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J Vet Intern Med.* 16, 34–44.

Gómez-Ochoa P., Castillo J.A., Gascon M. Zarate J.J., Alvarez F., Couto C.G., 2009. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet. J.* 179, 259–263.

Gómez-Ochoa P., Sabate D., Homedes J., Ferrer L., 2012. Use of the nitro-blue tetrazolium reduction test for the evaluation of domperidone effects on the neutrophilic function of healthy dogs. *Vet. Immunol.Immunopathol* 146, 97–99.

Gradoni L. 2001. Recenti sviluppi nella terapia delle leishmaniosi. *Ann Ist Super Sanità* 37, 255-263.

Gramiccia M., 1997. Old world leishmaniasis. *Ann Ist Super Sanità*, 33, 231-239.

Gramiccia M., Gradoni L., Orsini S., 1992. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 86, 613-20.

Guernaoui S., Boumezzough A., Laamrani A., 2006. Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. *Acta Trop* 97, 346-51.

Howard M.K., Soyers G., Miles M.A., 1987. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance and infectivity. *Exp Parasitol* 6 147-156.

Kato H., Uezato H., Katakura H., Calvopina M., Marco J.D., Barroso P.A., Gomez E.A., Mimori T., Korenaga M., Iwata H., Nonaka S., AND Hashiguki Y., 2005. Detection and Identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 72, 87-93.

Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Bailly, M. 1984. Ecology of leishmaniasis in the south of France. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the C´evennes. *Annales de Parasitologie Humaine et Compar´ee*, 59, 555–572.

Lainson R. and Shaw, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, W. Peters and R. Killick-Kendrick, (eds), 1–120. London: Academic Press.

Manna L., Reale S., Picillo E., Vitale F., Gravino A.E. 2008a. Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and Leishmania DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. *Cytokine* 44, 288-92.

Manna L., Gravino A.E., Picillo E., Decaro N., Buonavoglia C. 2008b. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Ann N Y Acad Sci* 1149, 358-60.

Manna L., Vitale F., Reale S., Picillo E., Neglia G., Vescio F., Gravino A.E., 2009. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Vet J* 182, 441-5.

Marfurt J., Nasereddin A., Niederwieser I., Jaffe C.L., Beck H.P., Felger I., 2003a. Identification and differentiation of Leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 41, 3147–3153.

Marfurt J., Niederwieser I., Makia ND., Beck HP., Felger I., 2003b. Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis* 46,115–124.

Maroli M., 1983. Laboratory colonization of *Phlebotomus perfiliewi* (Parrot). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 876-7

Maroli M., Fiorentino S., Guandalini E., 1987. Biology of a laboratory colony of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 24, 547-51.

Maroli M., Ascione R., Gradoni L., Gramiccia M., Bigliocchi F., Khoury C. 1994a,. Indagine sui vettori della leishmaniosi in tre focolai della Campania. *Parassitologia*, 36, 89.

Maroli M., Bigliocchi F., Khoury C., 1994b. I flebotomi in Italia: osservazioni sulla distribuzione e metodi di cattura. *Parassitologia*, 36: 251-264.

Maroli M., Sansoni L., Bigliocchi F., Khoury C., Valsecchi M., 1995. Reperimento di *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 (= *P. major* s.l.) in un focolaio di leishmaniosi nel nord Italia (Provincia di Verona). *Parassitologia* 37, 241-244.

Maroli M., Khoury C., 1998. Leishmaniasis vectors in Italy. *G Ital Med Trop* 3, 67-72.

Maroli M., Khoury C., Bianchi R., Ferroglio E., Natale A., 2002. Recent findings of *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 in Italy and its western limit of distribution. *Parassitologia* 44, 103-109.

Maroli M., Gradoni L., Oliva G., Castagnaro M., Crotti M., Lubas G., Paltrinieri S., Roura X., Zatelli A., Zini Z., 2009. Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte III: Prevenzione Veterinaria, 23,

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 leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine and International Health* 13, 256-264.

Maroli M., Feliciangeli M. D., Bichaud L., Charrel R.N., Gradoni L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Ent* 27, 123–147.

Martini M. Lefebvre and J. A. Rioux. 1995. Leishmania-human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J Infect Dis* 172, 323–326.

Martin-Sanchez J., Morales-Yuste M., Acedo-Sanchez C., Baròn S., Diaz V., Morillas-Marquez F., 2009. Canine Leishmaniasis in Southeastern Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 795-798.

Mauricio I.L., Stothard J.R. and Miles M.A. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 16, 188–189.

Miranda S., Roura X., Picado A. Ferrer L, Ramis A., 2008. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, 85, 35–8.

Molineux D.H., Ashford R.V., 1983. *The biology of Trypanosoma and Leishmania parasite of man and domestic animals*, Taylor and Francis, Londra, 1-194

Montalvo A.M., Fraga J., Maes I., Dujardin J.C., Van der Auwera G., 2012. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis* 31, 1453–1461.

Moschin J.C., Ovallos F.G., Sei I.A., Galati E.A., 2013. Ecological aspects of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) of Serra da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan region, state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 16, 190-201.

Mukherjee S., Quamarul Hassan M., Ghosh A., Ghosh K.N., Bhattacharya A. & Adhya, S., 1997. *Leishmania* DNA in *Phlebotomus* and *Sergentomyia* species during a kala-azar epidemic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57, 423–425.

Nasereddin A., Bensoussan-Hermano E., Schönian G., Baneth G., Jaffe C.L., 2008. Molecular diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis and species identification by use of a reverse line blot hybridization assay. *J Clin Microbiol* 46, 2848–2855.

Naucke T.J., Lorentz S., Rauchenwald F., Aspöck H., 2011. *Phlebotomus* (Transphlebotomus) *mascittii* Grassi, 1908, in Carinthia: first record of the

occurrence of sandflies in Austria (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasitology Research*, 109, 1161-1164.

Naucke T.J., Lorentz S., 2012. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, 5: 67, doi: 10.1186/1756-3305-5-67.

Noli, C., 1999. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus* 9, 16–24.

Novo S., Leles D., Bianucci R., Araujo A., 2015. *Leishmania tarentolae* molecular signatures in a 300 hundred-years-old human Brazilian mummy. *Parasites & Vectors*, 8, 72.

Ochsenreither S., Kuhls K., Schaar M., Presber W., Schonian G. 2006. Multilocus Microsatellite Typing as a New Tool for Discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 495–503.

Odiwuor S.O., Saad A.A., De Doncker S., Maes I., Laurent T., El Safi S., Mbuchi M., Buscher P., Paradies P., Sasanelli M., Amato M.E., Greco B., De Palo P., Lubas G.. 2012. Monitoring the reverse to normal of clinico-pathological findings and the disease free interval time using four different treatment protocols for canine leishmaniosis in an endemic area. *Res Vet Sci* 93, 843-7.

Oliva G., Roura X., Crotti A., Maroli M., Castagnaro M., Gradoni L., Lubas G., Paltrinieri S., Zatelli A., Zini E., 2010. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 236, 1192-8.

Oliva G., Roura X., Crotti A., Fondati A., Gradoni L., Lubas G., Maroli M., Paltrinieri S., Zatelli A., Zini E., 2011. Leishmaniosi Canina aggiornamenti su diagnosi e terapia. Parte II: terapia. *Veterinaria*, 25, 7-16.

Orlando T.C., Rubio M.A.T., Sturm N.R., Campbell D.A., Floeter-Winter L.M., 2002. Intergenic and External Transcribed Spacers of Ribosomal RNA Genes in Lizard-infecting *Leishmania*: Molecular Structure and Phylogenetic Relationship to Mammal-infecting *Leishmania* in the Subgenus *Leishmania* (*Leishmania*) Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 97, 695-701.

Otranto D., Capelli G., Genchi C., 2009. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasites & Vectors* 2, 1-8.

Paltrinieri S., Solano-Gallego L., Fondati A., Lubas G., Gradoni L., Castagnaro M., Crotti A., Maroli M. Oliva G., Roura X., Zatelli A., Zini E., 2010. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*, 236, 1184-1191.

Paradies P., Sasanelli M., Amato M.E., Greco B., De Palo P., Lubas G., 2012. Monitoring the reverse to normal of clinico-pathological findings and the disease free interval time using four different treatment protocols for canine leishmaniosis in an endemic area. *Res Vet Sci*, 93, 843-7.

Pierantozzi M., Roura X., Paltrinieri S., Poggi M., Zatelli A. 2013. Variation of Proteinuria in Dogs with Leishmaniasis treated with Meglumine Antimoniate and Allopurinol: A Retrospective Study. *J Am Anim Hosp Assoc* 49, 231-6.

Poglayen G., Marangon S., Manca M.G., Capelli G., Dalla Pozza M., Casati D., Vantini E., Bressan G., Passarini G., 1997. A new outbreak of canine leishmaniosis in the North-East of Italy. *Acta Parasitologica Turcica*, 21, 143.

Pozio E, Gradoni L, Gramiccia M, 1985. Canine leishmaniasis in Italy from 1910 to 1983. *Ann Parasitol Hum Comp*, 60, 543-553.

Pratlong F., Rioux J.A., Marty P., Faraut-Gambarelli F., Dereure J., Lanotte G. and Dedet J. P., 2004. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the

south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J Clin Microbiol* 42, 4077–4082.

Raymond F., Boisvert S., Roy G., Ritt J.F., Le´ gare´ D., Isnard A., Stanke M., Olivier M., Tremblay M.J., Papadopoulou B., Ouellette M., and Corbeil J. 2012. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*, , 40, 1131–1147.

Ready P.D., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, 15 pii=19505.

Ribeiro J.M., 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4, 143-52.

Rioux J.A., Killick-Kendrick R., Leaney A.J., Turner D.P., Bailly M. & Young C.J., 1979. Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France—12. Dispersion horizontale de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Esperience preliminaires. *Annales de Parasitologie Humane et Compar´ee*, 54, 673–682.

Rioux J.A., Lanotte G., Serres E., Pratlong F., Bastien P., Perieres J., 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes, suggestions for a new classifications. *Ann Parasitol Hum Comp* 65, 111-125.

Romi R., Khoury C., Bianchi R., Severini F (Ed.), 2012. Artropodi di interesse sanitario in Italia e in Europa. Roma (Rapporti ISTISAN 12/41).

Romi R., Khouri C., Bigliocchi F., Maroli M. (Ed) 1994. Schede guida su acari e insetti di interesse sanitario. Istituto Superiore di Sanità ISTISAN 94/8.

Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2008. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a

high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop.* 105, 158–165.

Rossi L., Ferroglio E., Guiso P., Ferrasi P., Pancaldi P., 1999. Segnalazione di un focolaio di leishmaniosi canina sulla collina torinese. *Medicina Veterinaria Preventiva*, 20, 20.

Rougier S., Vouldoukis I., Fournel S., Pérès S., Woehrlé F., 2008. Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: a pilot study. *Vet Parasitol* 153, 244-54.

Rougier S., Hasseine L., Delaunay P., Michel G., Marty P., 2012. One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 186, 245-53.

Roura X., Fondati A., Lubas G., Gradoni L., Maroli M., Oliva G., Paltrinieri S., Zatelli A., Zini E. 2013. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: a working group report. *Vet J* 198, 43-7.

Sabaté D., Llinás J., Homedes J., Sust M., Ferrer L. 2014. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence. *Prev Vet Med* 115, 56–63.

Sacks D.L., Hieny S., Sher A., 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between non-infective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol.* 135, 564-569.

Samy A.M., Doha S.A., Kenawy M.A., 2014. Ecology of cutaneous leishmaniasis in Sinai: linking parasites, vectors and hosts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 109, 299-306.

Saraiva E.M.B., Andrade A.F.B., Pereira M.E.A., 1986. Cell surface carbohydrate of *Leishmania mexicana amazonensis*: differences between infective and non-infective forms. *Eur J Cell Biol* 40, 219-225.

Saridomichelakis M., 2009. Advanced in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implication. *Vet Dermatol* 20, 471-489.

Schantz P.M., Steurer F.J., Duprey Z.H., Kurpel K.P., Barr S.C., Jackson J.E., Breitschwerdt E.B., Levy M.G., Fox J.C., 2005. Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. *J. Am Vet Med Assoc* 226, 1316–1322.

Schettini D.A., Costa Val A.P., Souza L.F., Demicheli C., Rocha O.G., Melo M.N., Michalik M.S. Frezard F. 2005. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. *Braz J med Biol Res* 38, 1879-1883.

Schonian G., Nazereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Shallig H., Presber W., Jaffe C., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47, 349-358.

Schonian G., Kuhls K., Mauricio I.L., 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 138, 405-25.

Seimenis A., Morelli D., Mantovani A., 2006. Zoonoses in the Mediterranean Region. *Ann Ist Super Sanità* 42, 437-44.

Senghor M.W., Niang A.A., Depaquit J. et al., 2011. Canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Sergentomyia* species (Diptera: Psychodidae) in Senegal: ecological, parasitological and molecular evidences. 7th International

Symposium on Phlebotomine Sandflies, 25–30 April 2011, Kuadasi, Abstract Book, pp. 47–48.

Signorini M., Drigo M., Marcer F., Frangipane di Regalbono A., Gasparini G., Montarsi F., Pietrobelli M., Cassini R., 2013. Comparative field study to evaluate the performance of three different traps for collecting sand flies in northeastern Italy *Journal of Vector Ecology* 38, 374-378.

Solano-Gallego L., Llull J., Ramos G., Riera C., Arboix M., Alberola J., Ferrer L., 2000. The Ibizaian hound presents predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90, 37–45.

Solano-Gallego L., Koutinas A., Miro 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.

Solano-Gallego L., Mirò G., Koutinas A., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G. 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 4, 86.

Stevenson L.G., Fedorko D.P., Zelazny A.M., 2010. An enhanced method for the identification of *Leishmania* spp. using real-time polymerase chain reaction and sequence analysis of the 7SL RNA gene region. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66, 432–435.

Talmi-Frank D., Nasereddin A., Schnur L.F., Schönian G.O., Ozensoy Töz S., Jaffe C.L., Baneth G., 2010. Detection and identification of Old World *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 4, 581.

Tassi P., Ormas P., Madonna M., Carli S., Belloli C., De Natale G., Ceci L., Marcotrigiano G.O., 1994. Pharmacokinetic of N-methylglucamine antimoniate after

intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res Vet Sci* 56, 144-150.

Torres M., Bardagí M., Roura X., Zanna G., Ravera I., Ferrer L., 2011. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 188, 346-51.

Terayama Y., Kato H., Gomez E.A., Uezato H., Calvopiña M., Iwata H., Hashiguchi Y., 2008 Molecular typing of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from areas endemic for Leishmaniasis in Ecuador by PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA gene. *J Vet Med Sci.* 70, 907-13.

Valladares J.A., Alberola J., Esteban M. Arboix M. 1996. Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dog. *Vet Rec* 138, 1181-183.

Valladares J.E., Riera C., Gonzalez-Ensenyat P., Diez-Cascon A., Ramos G., Solano-Gallego L., Gallego M., Porùts M., Arboix M., Iberola J., 2001. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using an antimony liposomal formulation. *Vete Parasitol*, 97, 15-21.

Van der Auwera G., Maes I., De Doncker S., Ravel C., Cnops L., Van Esbroeck M., Van Gompel A., Clerinx J., Dujardin J.C., 2013. Heat-shock protein 70 gene sequencing for Leishmania species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill* 18, 20543.

Van der Auwera G., Christophe R., Verweij J.J., Bart A., Schönian G., Felgerf I., 2014. Evaluation of Four Single-Locus Markers for Leishmania Species Discrimination by Sequencing. *J Clin Microbiol* 52, 1098–1104.

Van Eys G.J., Schoone G.J., Kroon N.C., Ebeling S.B., 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 51, 133-142.

Van Zandbergen G., Klinger M., Mueller A., Dannenberg S., Gebert A., Solbach W., Laskay T., 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages *J Immunol.* 173, 6521-5.

Venezian Scarascia M.E., Perini L., Ceccarelli T., Ranuzzi M., Zitti M., Salvati L. 2007 *Ecosistemi sotto pressione nel Lazio. ITAL-ICID Geva Edizioni Roma.*

Winberg M.E. Rasmusson B., Sundqvist T., 2007. Leishmania donovani: inhibition of phagosomal maturation is rescued by nitric oxide in macrophages. *Exp Parasitol*, 117, 165-70.

WHO (1979). Control of leishmaniasis. Report of a WHO Export Committee. Technical Report, 793: 158.

WHO (2010) Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010. WHO technical report series 949. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Woerly V., Maynard L., Sanquer A., Eun H.M. 2009. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol Res* 105, 463-9.

Zelazny A.M., Fedorko DP, Li L., Neva F.A., Fischer S.H., 2005. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of Leishmania spp. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 415–420.

http://it.wikipedia.org/wiki/Provincia_di_Rieti

http://www.di.unipi.it/~mogorov/Dispensa_Cartografia_Trevisani.pdf

http://it.wikipedia.org/wiki/Sistema_informativo_territoriale

http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=812&area=Malattie%20infettive&menu=vuoto

www.iris-kidney.com

http://www.simi.iss.it/progetto_simi.htm#Organizzazione_attuale

<http://www.worldclim.org/>

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il mio relatore Giovanni Poglayen e Gladia Macrì, mia ideale correlatrice, per il sostegno dato alla realizzazione di questo lavoro. Laura Salvato per il prezioso aiuto fornitomi nelle PCR. Un ringraziamento particolare va al carissimo Michele Maroli che mi ha generosamente donato parte del suo tempo e delle sue competenze. Ringrazio moltissimo Marina Gramiccia e Trentina di Muccio per l'ospitalità ed il supporto diagnostico nelle tipizzazione di S.tarentolae. Un grazie va ai colleghi dell'IZS Pasquale Rombolà, Paola Scaramozzino, Francesca Iacononi e Claudio De Liberato senza i quali questa tesi non sarebbe stata possibile. Infine ringrazio e saluto la mia bellissima famiglia.