

LEISHMANIOSI CANINA ed ANALISI di LABORATORIO: Come sfruttarli al massimo per la diagnosi ed il monitoraggio

Introduzione

La leishmaniosi è una diffusa e frequente malattia infettiva protozoaria trasmessa da un insetto flebotomo, sostenuta da *Leishmania infantum*, associata a differenti presentazioni cliniche ed a notevole morbilità e – nonostante terapie appropriate e mirate – a mortalità rilevante. L'importanza della patologia è legata anche al potenziale carattere zoonosico, rappresentando pertanto il cane un potenziale serbatoio di riserva del parassita per l'uomo.

La finalità della presente trattazione è descrivere le principali alterazioni di laboratorio che si possono identificare in corso di leishmaniosi canina, e prendere in rassegna i test di laboratorio utili al clinico per inquadrare accuratamente la patologia sia da un punto di vista diagnostico che di monitoraggio terapeutico.

Premessa essenziale è chiarire alcune definizioni dello "stato" clinico del paziente. Infatti, in corso di leishmaniosi i pazienti possono essere suddivisi in tre stadi in base ad una combinazione di segni clinici e rilievi di laboratorio. I cani possono essere suddivisi in "esposti", "infetti" e "malati".

- **Esposti:** pazienti clinicamente normali – o con segni clinici riconducibili ad altre malattie – che posseggono titoli anticorpali negativi o bassi (inferiori di 4 volte il titolo anticorpale "soglia" – o valore soglia - del laboratorio), che sono negativi alla ricerca del parassita mediante citologia e /o PCR, ma che vivono, o hanno vissuto, in aree geografiche in cui è confermata la presenza del flebotomo.
- **Infetti:** pazienti clinicamente normali – o con segni clinici riconducibili ad altre malattie – senza alterazioni di laboratorio, ma in cui è stata dimostrata la presenza del parassita nei tessuti mediante identificazione diretta (es. citologia e /o PCR). In questi pazienti i titoli anticorpali risultano negativi o bassi (inferiori di 4 volte il titolo anticorpale "soglia" del laboratorio) ma non sono presenti alterazioni clinico-patologiche riferibili a leishmaniosi.
- **Malati:** pazienti infetti, in cui la presenza del parassita è dimostrata mediante citologia e /o PCR, indipendentemente dal titolo anticorpale, o con titolo anticorpale uguale o superiore di 4 volte il valore "soglia" del laboratorio. In questi soggetti si identificano segni clinici e /o alterazioni clinico patologiche riferibili a leishmaniosi.
- **Gravemente malati:** pazienti in cui si identificano gravi condizioni cliniche quali nefropatia proteinurica, insufficienza renale cronica, ed affetti da problematiche concomitanti, correlate o meno a leishmaniosi, quali, patologie oculari gravi ed artropatie che richiedano terapie immunosoppressive. In questo stadio rientrano anche pazienti con patologie concomitanti, quali coinfezioni, patologie neoplastiche, endocrinopatie e malattie metaboliche, nonché quei soggetti che non rispondono adeguatamente alle comuni terapie leishmanicide.

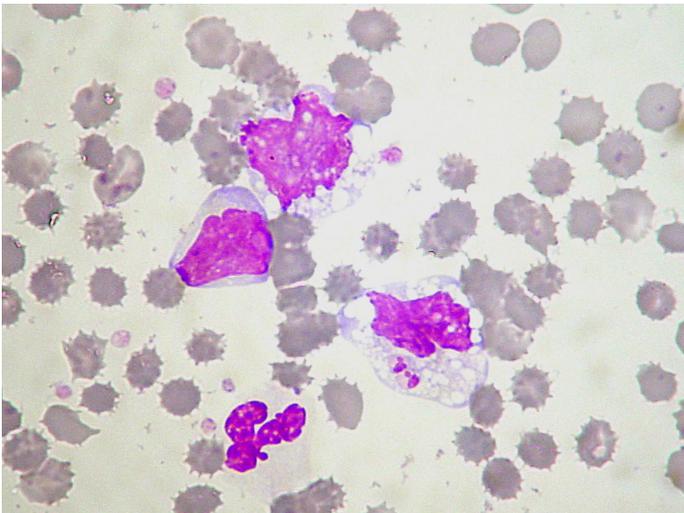
Alterazioni di laboratorio in corso di leishmaniosi

Accanto a segni clinici più o meno caratteristici, possono essere presenti alterazioni di laboratorio riconducibili a leishmaniosi e che talvolta possono anticipare segni clinici, in grado pertanto di indurre il sospetto della malattia protozoaria nel paziente. Inizieremo col trattare le alterazioni generiche relative ai profili emato-biochimici, per poi dedicarci ai test più specifici di infezione.

ALTERAZIONI EMATOLOGICHE

Le alterazioni ematologiche in corso di leishmaniosi sono non specifiche. In particolare il rilievo più comune consiste in un'anemia da "infiammazione cronica", moderata, non rigenerativa, normocita e normocromica. Tale anemia può essere anche la conseguenza di carenza di eritropoietina nel caso in cui sia presente una concomitante insufficienza renale cronica. In alcuni casi può essere presente anche una sottostante causa immunomediata (es. Anemia emolitica secondaria). L'infiammazione sistemica spesso presente è causa di una neutrofilia matura, associata o meno a monocitosi, linfocitosi o linfopenia, e occasionalmente eosinofilia. In una percentuale molto ridotta di casi possono essere presenti amastigoti di leishmania nei neutrofili circolanti. Infine, il rilievo di una lieve / moderata trombocitopenia rappresenta evenienza relativamente comune, conseguenza spesso di un fenomeno immunomediato, o a seguito di azione diretta del parassita a livello midollare (ridotta trombopoiesi). In caso di trombocitopenie gravi sono spesso presenti co-infezioni (ad esempio con ehrlichiosi).

Esempio di parassitemia: in questo striscio ematico di cane sono presenti monociti contenenti amastigoti di *Leishmania* fagocitati, evento insolito e spesso associato a grave ipofestazione midollare.



Alcuni autori hanno segnalato che la determinazione citofluorimetrica su sangue periferico del rapporto dei linfociti CD4/CD8 in pazienti affetti da leishmaniosi può avere rilevanza clinica. La riduzione della risposta Th1 (cellulo mediata), e di conseguenza un'aumentata predisposizione alla comparsa di segni clinici collegati a leishmaniosi, è spesso associata ad un basso rapporto CD4/CD8 dovuto ad una riduzione del numero dei linfociti CD 4+: è più frequente pertanto che segni clinici si identifichino in pazienti con basso rapporto CD4/CD8. A motivo peraltro della notevole variabilità individuale, tale rapporto viene consigliato più per il monitoraggio terapeutico rispetto al suo utilizzo per la diagnosi, in soggetti con segni clinici potenzialmente riferibili a questa malattia protozoaria. Questo test viene eseguito su sangue periferico senza particolari accorgimenti tecnici, se non quello di poter analizzare un campione relativamente fresco (entro 24 ore dal prelievo)

ALTERAZIONI del MIDOLLO OSSEO

Le alterazioni ematologiche si accompagnano ad anomalie di differente entità a carico del midollo osseo. Può identificarsi un'ipoplasia eritroide, associata talvolta ad iperplasia mieloide con incremento del rapporto M:E, riferibile ad una risposta alla malattia cronica. Può essere presente un'infiammazione midollare concomitante con aumento dei macrofagi che possono contenere

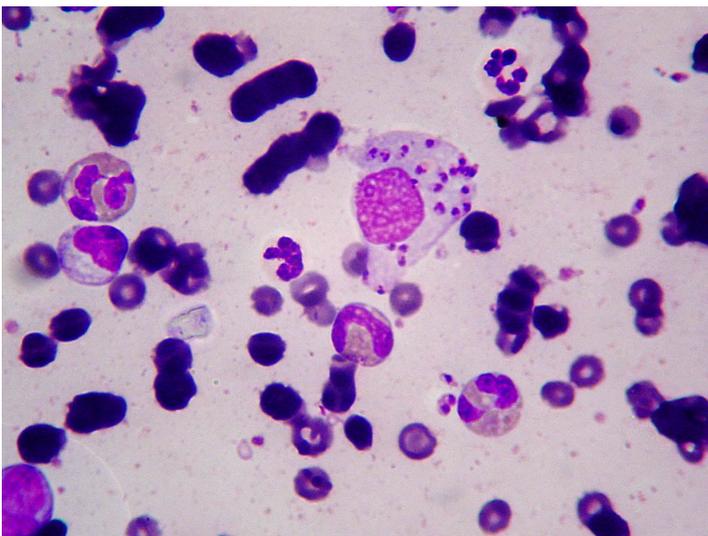
amastigoti di leishmania, aumento dei neutrofili, plasmacitosi e linfocitosi. La serie megacariocitica può presentare aspetti di iperplasia o di ipoplasia.

In alcune occasioni possono identificarsi caratteri di displasia (dismielopiesi) in cui – accanto solitamente a citopenie periferiche – si possono identificare ipercellularità del midollo osseo con displasia a carico di differenti linee cellulari. Occorre peraltro sottolineare come la presenza di dismielopoesi non sia riferibile sempre e solo a leishmaniosi a meno di identificate amastigoti a livello midollare. La presenza di sindromi mieloidisplastiche deve pertanto essere valutata accuratamente mediante sierologia o valutazione del midollo mediante citologia o PCR.

A questo proposito, la valutazione del midollo osseo permette spesso di emettere diagnosi di leishmaniosi nel caso in cui si identifichi il parassita. Secondo alcuni inoltre autori la carica parassitaria permette di differenziare tra un animale solamente infetto (carica parassitaria bassa) ed uno malato (carica parassitaria elevata), anche se questa associazione non è condivisa da tutti gli autori (sono talvolta possibili infatti concentrazioni parassitarie elevate a dispetto di segni clinici estremamente scarsi).

L'esame del midollo osseo per la ricerca dei parassiti è, come vedremo più avanti, uno step molto importante nella ricerca diretta di Leishmania.

Esempio di infestazione midollare da Leishmania: il campione appare ipocellulare ma è ben evidente la presenza di amastigoti fagocitati da un macrofagi e liberi sul fondo.



ANOMALIE della COAGULAZIONE

Le anomalie della coagulazione non sono molto frequenti in corso di leishmaniosi. Prolungamenti dei tempi di coagulazione possono essere la conseguenza di fenomeni di coagulazione vasale disseminata, peraltro poco comune. Di contro, una ipercoagulabilità può rappresentare la conseguenza di perdita di antitrombina III secondaria ad eventuali nefropatie proteino-disperdenti. Ipercoagulabilità può verificarsi anche per la sindrome da iperviscosità conseguenza di iperglobulinemia.

ALTERAZIONI BIOCHIMICHE

La presentazione clinica da pazienti affetti da leishmaniosi può essere particolarmente variabile, come le anomalie biochimiche che possono rappresentare la conseguenza di alterazioni epatorenali o essere la conseguenza dei rilevanti fenomeni infiammatori che possono verificarsi a seguito della malattia infettiva.

Anomalie della funzionalità renale

La deposizione di immunocomplessi a livello glomerulare è responsabile della nefropatia proteinurica. La conseguente insufficienza renale cronica si caratterizza per glomerulosclerosi, ipertensione e nefrite tubulointerstiziale. Come per ogni insufficienza renale cronica, anche in corso di leishmaniosi risulta pertanto necessario monitorare creatinina e urea, proteinuria e peso specifico urinario. La valutazione della creatinina sierica rappresenta pertanto il test attualmente più indicato in corso di leishmaniosi per valutare la riduzione della GFR, anche se sono oggetto di studio altri biomarker più precoci quali cistatina C e SDMA, che peraltro, al momento, non hanno dimostrato un reale valore aggiunto rispetto alla valutazione della creatininemia. Risulta sempre necessario anche eseguire l'esame delle urine. In particolare il peso specifico urinario tende a diminuire a seguito della ridotta capacità di concentrazione delle urine da parte dei reni, e la valutazione del sedimento deve essere effettuata sia per valutare eventuale cilindruria, sia al fine di verificare eventuali infezioni urinarie che possono complicare la leishmaniosi, ed alterare la valutazione della proteinuria. A questo proposito, la valutazione della proteinuria è un test assolutamente necessario in corso di leishmaniosi, poichè la proteinuria stessa può essere responsabile della progressione dell'insufficienza renale cronica e può essere pertanto necessario controllarla con apposite terapie.

Le urine dovrebbero essere raccolte mediante cistocentesi, anche se un primo screening potrebbe essere fatto su urine raccolte mediante minzione spontanea, in caso di sedimento inattivo. La presenza di tracce di proteine alla striscia reattiva, in concomitanza ad un basso peso specifico urinario, oppure se presente una proteinuria evidente alla striscia reattiva indipendentemente dal peso specifico, rappresentano evidenze inconfutabili di proteinuria. In tal caso la proteinuria deve essere quantificata mediante PU/CU: valori superiori a 0,5 sono riferibili a proteinuria, mentre valori compresi tra 0,2 e 0,5 sono considerati "borderline" e necessitano di controllo successivo. La valutazione delle urine mediante elettroforesi in base al peso molecolare (SDS-AGE) rappresenta un test diagnostico molto importante, utile a fornire indicazioni precoci relative alla localizzazione del danno tubulare o glomerulare. E' stato dimostrato come la maggior parte dei cani leishmaniotici abbia proteinurie miste, tubulo-glomerulari. L'SDS-AGE si correla bene agli esiti di eventuali biopsie renali.

Anomalie proteiche

I pazienti con leishmaniosi clinicamente manifesta sintetizzano numerose proteine di natura flogistica, anticorpi compresi. Elettroforesi delle sieroproteine e misurazione delle proteine di fase acuta (APP) sono di supporto nella diagnosi della malattia e risultano utili anche per monitorare l'evoluzione della stessa o la risposta alla terapia.

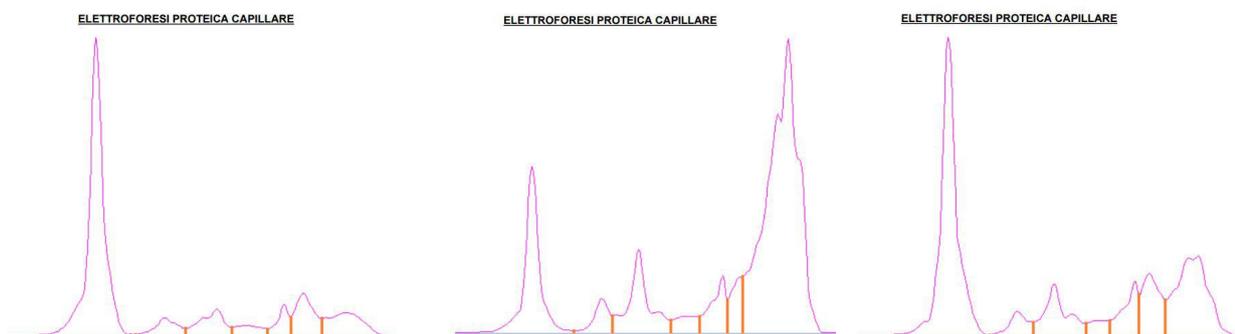
Le proteine totali e le globuline tendono ad incrementare proporzionalmente alla gravità dei segni clinici, ad eccezione delle albumine che rappresentano una proteina di fase acuta negativa, e che possono inoltre essere perse in corso di nefropatia proteino-disperdente.

Il tipico quadro elettroforetico in corso di leishmaniosi si caratterizza per ipoalbuminemia, incremento delle alfa2 globuline (ove migrano le proteine di fase acuta) ed ipergammaglobulinemia policlonale, conseguente ad incremento degli anticorpi circolanti, e degli immunocomplessi. Occasionalmente si identificano incrementi delle beta globuline. La gammopatia è spesso policlonale, ma non raramente possono identificarsi gammopatie oligoclonali e raramente monoclonali. Le APP rappresentano un importante biomarker di infiammazione, e per questo motivo tendono ad essere estremamente elevate in corso di leishmaniosi. Tra le APP che incrementano sono segnalate proteina C reattiva (CRP), ceruloplasmina (Cp), aptoglobina (Hp), siero amiloide-A (SAA) e ferritina. Parimenti, tendono a

diminuire proteine di fase acuta negativa: albumine – come già riportato – ma anche transferrina e PON-1.

Occorre infine sottolineare come le alterazioni delle APP non siano diagnostiche di leishmaniosi clinicamente manifesta: possono incrementare anche in pazienti infetti ma senza segni clinici, oppure in pazienti con altre malattie infettive differenti o da numerose altre condizioni infiammatorie e neoplastiche.

Nelle seguenti immagini vi mostriamo tre esempi di tracciato elettroforetico: il primo in un cane sano; il secondo in un cane con leishmaniosi conclamata e poliartrite, grave ipo-albuminemia, iperglobulinemia e gammopatia policlonale; infine il terzo appartenente allo stesso cane dopo alcuni mesi dalla terapia leishmanicida.



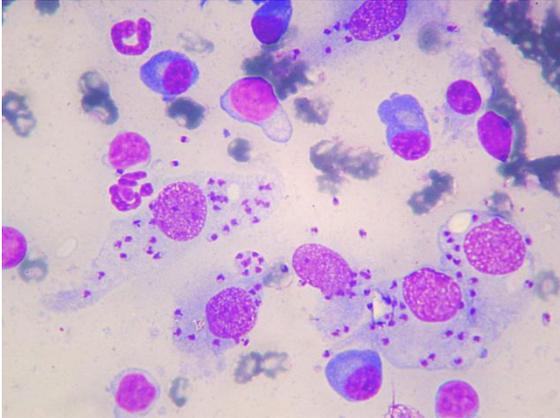
Test per la diagnosi eziologica di Leishmaniosi

I test per l'identificazione di infezione da Leishmania si dividono in test diretti ed indiretti.

Test diretti: queste metodiche permettono l'identificazione del parassita mediante tecniche microscopiche (citologia, istologia, immuno-istochimica) o di frammenti del suo genoma (es. Polymerase Chain Reaction, PCR).

Citologia: la diagnosi certa di infezione è garantita dall'individuazione di amastigoti in campioni di tessuti infetti. Va sottolineato che la visualizzazione del parassita non indica necessariamente una condizione di malattia conclamata, sebbene solitamente l'individuazione di amastigoti al microscopio sia associato a patologia, ed il loro numero alla carica parassitaria nel tessuto infettato. Al contrario, la mancata individuazione citologica del parassita non può escludere un'infezione in corso; in caso di persistente sospetto clinico è consigliabile ricorrere pertanto a metodiche di ricerca di tipo molecolare (PCR), molto più sensibili. Gli amastigoti possono essere individuati in qualsiasi tessuto o fluido biologico, e anche all'interno di neoplasie. Ogni volta che ci si trova di fronte a lesioni sospette, superficiali o profonde, è consigliabile il campionamento citologico. Tuttavia ci sono tessuti in cui è molto più elevata la probabilità di individuare il parassita: ci riferiamo al midollo osseo ematopoietico e agli organi linfoidei (linfonodi in particolare).

Esempio di campione citologico linfonodale in cui si riconoscono numerosissimi amastigoti di Leishmania, oltre a cellule linfoidei miste e macrofagi.



Istologia ed immuno-istochimica: gli amastigoti possono essere individuati nei tessuti infetti, tuttavia la loro identificazione è molto meno agevole che in citologia. Per tale ragione, in caso di lesioni sospette, la diagnosi definitiva richiede il ricorso alle tecniche di immuno-istochimica per accertare la presenza degli antigeni parassitari. Sui campioni istologici è inoltre possibile eseguire tecniche di biologia molecolare come la PCR, sebbene siano da preferirsi altri substrati non fissati in formalina (vedi sotto).

PCR: diverse varianti di PCR sono disponibili, tutte però hanno lo scopo di individuare piccoli frammenti specifici di genoma parassitario. Si possono usare PCR qualitative (convenzionale e “nested” a maggiore sensibilità) che conferiscono esclusivamente risultati “negativo vs positivo”, oppure di tipo quantitativo che permettono di quantificare le copie di DNA amplificate. Queste ultime quindi sono utili per quantificare la carica parassitaria e possono essere utilizzate nel monitoraggio delle terapie: conoscendo la carica iniziale si possono fare controlli seriali nel tempo sul medesimo tessuto per verificare l’effettiva riduzione della carica parassitaria stessa. Molti tessuti e fluidi biologici possono essere utilizzati quali substrati per la ricerca mediante PCR, inclusi sangue, sangue midollare, urine, tamponi salivari/oculari e strisci citologici. Tuttavia, per avere una sensibilità diagnostica ottimale si consiglia di utilizzare preferenzialmente campioni di midollo osseo (sangue midollare in EDTA) e strisci linfonodali (normali strisci ottenuti mediante FNA convenzionale, colorati o tal quali). Non sono necessari particolari accorgimenti di conservazione ed invio del materiale, in quanto il DNA è molto stabile.

Test indiretti: questi metodi non permettono di individuare direttamente gli agenti eziologici, ma mettono in evidenza alcune alterazioni clinico-patologiche specifiche indotte dall’infezione. In particolare si ricorre all’identificazione di anticorpi specifici prodotti dalla risposta immunitaria contro il parassita (test sierologici). Va ricordato che gli anticorpi contro la Leishmania iniziano a comparire in maniera significativa solo dopo 3-6 mesi dall’infezione.

Ci sono diversi tipi di test sierologici: quelli rapidi, basati su metodiche ELISA o immunocromatografiche, facili da usare anche in sede ambulatoriale, ma che possono solo dare risultati del tipo “positivo vs negativo” senza poter specificare il titolo anticorpale presente. Questi test hanno una sensibilità diagnostica piuttosto bassa (soprattutto in pazienti con titoli bassi), mentre la loro positività si associa solitamente a titoli elevati e quindi a stadi per lo più patologici (buona specificità).

I test quantitativi possono utilizzare la metodica dell’immunofluorescenza indiretta (IFI) o dell’ELISA. La prima ha lo svantaggio di essere una metodica quantificabile in maniera soggettiva attraverso la valutazione di vetrini al microscopio a fluorescenza, ed è pertanto operatore dipendente. Per tale ragione è consigliabile, in caso di controlli seriali, utilizzare sempre lo stesso

laboratorio. Inoltre per valutare effettivi cambiamenti di titolo nel tempo, si devono prendere come significativi solo variazioni pari almeno a 4 volte il titolo iniziale (in più o in meno). La seconda invece è quantificabile in maniera oggettiva mediante lettori ELISA e non è quindi operatore dipendente. Entrambi i metodi sierologici quantitativi presentano svantaggi e vantaggi: titoli bassi sono comuni in pazienti esposti ma non infetti o malati, e devono sempre essere interpretati con cautela. Titoli elevati sono invece più facilmente associati a reale infezione/malattia. Noi consigliamo tuttavia di considerare i test sierologici come esami di screening di base e di confermarli mediante ricerca diretta prima di emettere una diagnosi definitiva e di iniziare le terapie leishmanicide specifiche.

Come monitorare la terapia ed il follow-up mediante gli esami di laboratorio

I test di laboratorio sono in questa fase indirizzati a monitorare eventuali effetti collaterali della terapia intrapresa, ed a controllare le condizioni cliniche dei pazienti, oltre allo stato dell'infezione.

- Gli effetti tossici (renali, cardiaci, pancreatici) degli antimoniali sono estremamente rari e pertanto da monitorare solo in pazienti selezionati o a rischio. L'allopurinolo invece può essere responsabile della formazione di cristalli o di uroliti di xantina. Pertanto, le urine di pazienti a cui viene somministrato allopurinolo per periodi prolungati devono essere periodicamente controllate. Raramente però si osserva la formazioni di uroliti voluminosi che necessitano un intervento medico/chirurgico
- A motivo del polimorfismo delle presentazioni cliniche dei soggetti affetti da leishmaniosi, è impossibile definire a priori quali analisi di laboratorio dovrebbero essere periodicamente controllate. In linea generale dovrebbe essere monitorato lo stato di funzionalità renale e lo stato infiammatorio. Pertanto consigliabile controllare periodicamente creatinina sierica, e proteinuria semiquantitativa (striscette) e quantitativa (PU/CU), trattandole seguendo le linee guida IRIS (www.iris-kidney.com). Relativamente allo stato infiammatorio risulta opportuno controllare proteine totali, elettroforesi delle sieroproteine ed APP (in particolare CRP ed SAA).
 - Le proteine di fase acuta hanno il vantaggio di ritornare rapidamente alla normalità già dopo 15-30 giorni dalla terapia
 - L'elettroforesi richiede più tempo: non ha senso ri-controllarla prima di un mese dall'inizio della terapia, in quanto la normalizzazione del tracciato in caso di risposta efficace, richiede almeno 3-4 mesi
 - In caso di persistenza di un quadro infiammatorio a dispetto della terapia, va presa in considerazione l'eventuale presenza di altre malattie infiammatorie/infettive o anche neoplastiche concomitanti o un mancato successo terapeutico
 - Va ricordato che la risposta terapeutica ai diversi farmaci ha una velocità differente: l'antimoniato di N-metilglucamina è più rapido ad agire della miltefosina; nel caso si selezionino quest'ultima, i tempi sopra descritti possono risultare più dilatati
- Lo stato parassitologico dovrebbe essere monitorato mediante titoli anticorpali (sierologia) o mediante la valutazione diretta della presenza parassita. A questo proposito, titoli anticorpali post terapia tendono a diminuire dopo 30 giorni, in soggetti malati, con buona risposta alla terapia, anche se la maggior parte dei pazienti che rispondono maniera adeguata possono iniziare a manifestare riduzioni consistenti solo dopo 6 mesi o più. Occorre inoltre ricordare come in soggetti che vivono in aree endemiche la completa normalizzazione del titolo anticorpale spesso non sia possibile. La finalità sarebbe quella di raggiungere titoli anticorpali inferiori di 4 volte il titolo anticorpale "soglia" – o valore soglia - del laboratorio (soggetti "esposti"). Idealmente, al fine di valutare la completa efficacia

della terapia (eliminazione del parassita) sarebbe opportuno impiegare test molto sensibili quali la PCR quantitativa su midollo osseo, milza, linfonodi, che rappresentano peraltro metodiche un po' più invasive e non sempre percorribili, specie in pazienti in ottime condizioni di salute. Nella pratica clinica si ricorre pertanto ancora alla sierologia o eventualmente alla PCR quantitativa su sangue periferico (sebbene sarebbe più indicato il sangue midollare), che dovrebbe manifestare una riduzione "consistente" delle copie di parassita dopo 3 – 6 mesi dall'inizio della terapia ed una negativizzazione completa in 12 mesi.

Bibliografia

- Noli C. et al: An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet Journal* (2014); 202: 425-435.
- Paltrinieri S. et al: Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol* (2016); 45: 552–578.
- Roura X. et al: Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *Vet Journal* (2013); 198: 43-47.
- Solano-Gallego L. et al: LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors* (2011); 4: 86-101.