



Università degli studi di Messina
Dipartimento di Scienze Veterinarie

SSD VET/08

PhD in Scienze Veterinarie

Coordinatore: Prof. Rosalba Laurà

Impiego della Spettroscopia Raman
nella diagnosi della leishmaniosi canina

DOTTORANDO

Dott. Anastella Falcone

RELATORE

Prof. Elisabetta Giudice

INDICE

SUMMARY	pag. 3
RIASSUNTO	pag. 4
PREMESSA	pag. 5
1. SPETTROSCOPIA RAMAN	pag. 6
1.1 Introduzione	pag. 6
1.2 Cenni storici	pag. 6
1.3 Teoria dello <i>scattering</i> Raman	pag. 7
1.4 Spettrometro Raman	pag. 11
1.5 Spettro Raman	pag. 13
1.6 Applicazioni	pag. 15
1.6.1 Applicazioni in medicina veterinaria	pag. 18
1.7 Vantaggi e limiti della spettroscopia Raman per lo studio delle molecole biologiche	pag. 19
2. LA LEISHMANIOSI	pag. 21
2.1 Introduzione	pag. 21
2.2 Classificazione e cenni storici	pag. 23
2.3 Specie di <i>Leishmania</i> di interesse medico	pag. 26
2.4 Il vettore	pag. 27
2.5 La leishmaniosi canina (<i>L. infantum</i>)	pag. 29
2.5.1 Trasmissione	pag. 29
2.5.2 Epidemiologia	pag. 31
2.5.3 Morfologia del parassita	pag. 33
2.5.4 Ciclo biologico	pag. 34
2.5.5 Patogenesi e immunologia	pag. 36
2.5.6 Segni clinici	pag. 39
2.5.7 Alterazioni emato-biochimiche ed esami di laboratorio ...	pag. 42
2.5.8 Diagnosi	pag. 44
2.5.9 Stadiazione clinica	pag. 46
2.5.10 Terapia	pag. 50
2.5.11 Prognosi e monitoraggio	pag. 52
2.5.12 Prevenzione	pag. 53
2.5.13 Vaccini	pag. 55
3. PARTE SPERIMENTALE	pag. 57
3.1 Materiale e Metodi	pag. 57
3.2 Risultati	pag. 65
3.3 Discussione	pag. 70
3.4 Conclusioni	pag. 76
BIBLIOGRAFIA	pag. 77

SUMMARY – *Raman application for the diagnosis of canine leishmaniasis*

Leishmaniasis is a zoonosis of world interest, and one of the most important agent is *L. infantum*. Dogs are the principal reservoirs affected by a broad spectrum of clinical features. In the view of a more rapid and less expensive diagnosis of leishmaniasis, Raman spectroscopy, a rapid qualitative and quantitative technique that allows the simultaneous determination of several components in the biological fluids, was applied on the serum of not affected and affected dogs. Thirty-three dogs were divided into three groups based on their serological test for leishmaniasis (IFAT) and clinical status: Leishmania group (LG), constituted by 18 seropositive ill dogs; asymptomatic group (AG), constituted by 2 seropositive asymptomatic dogs; control group (CG), constituted by 14 healthy seronegative dogs. Blood samples were collected in tubes without anticoagulant during clinical exams. One aliquot was subjected to the Raman spectroscopic analysis. The acquired spectra, obtained from sera of LG and CG subjects were different in the region 1,200-1,370 cm^{-1} , in which it is possible to distinguish the amide III vibration (1,300 cm^{-1}). In LG an evident shift to the shortwave region is observed in spectral frequencies of the band centered at 1,250 cm^{-1} , corresponding to leucine and isoleucine. In AG, spectra were like the control group. In 5 dogs affected by leishmaniasis in which it was possible to follow the treatment the spectra were similar to those of healthy animals already after two weeks of therapy. These results were validated by statistical analysis by using the receiver operating characteristic (ROC) curve and the Youden index (Y) to obtain the optimal cut-off point, in order to distinguish between ill group and healthy one, demonstrating the achievability of Raman spectroscopy as rapid and less expensive diagnosis of full-blown leishmaniasis. Further studies are necessary to establish the diagnostic specificity and test reference range.

RIASSUNTO

La leishmaniosi è una zoonosi di interesse mondiale, e uno degli agenti più importanti è *L. infantum*. I cani sono i principali serbatoi interessati da un ampio spettro di caratteristiche cliniche. Nell'ottica di una diagnosi di leishmaniosi più rapida e meno dispendiosa, sul siero di cani sani e infetti è stata applicata la spettroscopia Raman, una tecnica rapida qualitativa e quantitativa che consente la determinazione simultanea di più componenti nei fluidi biologici. Trentatré cani sono stati divisi in tre gruppi sulla base del test sierologico per la leishmaniosi (IFAT) e dello stato clinico: gruppo Leishmania (LG), costituito da 18 cani sieropositivi; gruppo asintomatico (AG), costituito da 2 cani asintomatici sieropositivi; gruppo di controllo (CG), costituito da 14 cani sieronegativi sani. I campioni di sangue sono stati raccolti in provette senza anticoagulante durante gli esami clinici. Un'aliquota è stata sottoposta all'analisi spettroscopica Raman. Gli spettri acquisiti ottenuti da sieri di soggetti LG e CG erano differenti nella regione $1.200-1.370\text{ cm}^{-1}$, in cui è stato possibile distinguere la vibrazione dell'ammide III (1.300 cm^{-1}). In LG si osservava un evidente spostamento verso la regione delle onde corte nelle frequenze spettrali della banda centrata a 1.250 cm^{-1} riferibile a leucina e isoleucina. In AG gli spettri erano simili a quelli del gruppo di controllo. In n. 5 cani affetti da leishmaniosi in cui è stato possibile seguire il trattamento gli spettri erano assimilabili a quelli degli animali sani già dopo due settimane di terapia.

Questi risultati sono stati convalidati dall'analisi statistica utilizzando la curva della caratteristica di funzionamento del ricevitore (ROC) e l'indice di Youden (Y) per ottenere il punto di *cut-off* ottimale, al fine di distinguere tra il gruppo malato e quello sano, supportando l'impiego della spettroscopia Raman come diagnosi rapida ed economica della leishmaniosi conclamata. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per stabilire la specificità diagnostica e l'intervallo di riferimento del test.

PREMESSA

La leishmaniosi è una zoonosi di interesse globale, molto diffusa nell'area del Mediterraneo. I cani sono i principali serbatoi e l'infezione può produrre quadri clinici che possono assumere carattere di notevole gravità come anche rimanere a livello subclinico.

Sebbene sia una malattia molto conosciuta e la ricerca sia in continuo aggiornamento, la diagnosi è tutt'ora una sfida per il clinico, essendo necessaria una combinazione di esami di laboratorio diretti e indiretti, anche dispendiosi sia in termini economici che di tempo.

Poter disporre di una tecnica diagnostica rapida, economica e non invasiva rappresenterebbe una svolta positiva per la gestione della parassitosi, specie se applicabile nelle fasi precoci dell'infezione, prevenendo le possibili gravi compromissioni organiche.

La spettrofotometria Raman possiede un'interessante versatilità di applicazione che abbraccia molti ambiti, come quello della diagnostica biomedica. In particolare, la possibilità di determinare simultaneamente, in modo qualitativo e quantitativo, più componenti nei diversi fluidi biologici rappresenta una caratteristica di particolare rilievo scientifico.

In questo lavoro di tesi si è studiata l'applicabilità della tecnica Raman nella diagnosi della leishmaniosi canina.

Prima di esaminare le esperienze personali, viene effettuata una disamina sui punti più salienti inerenti alla spettroscopia Raman e alla leishmaniosi del cane.

Capitolo 1

SPETTROSCOPIA RAMAN

1.1 INTRODUZIONE

La spettroscopia Raman (RS) deve il suo nome al fisico indiano Chandrasekhara Venkata Raman. Egli notò che una piccola frazione della radiazione diffusa da certe molecole aveva energia diversa da quella della radiazione incidente, e che la differenza di energia era legata alla struttura chimica delle molecole responsabili della diffusione. Egli intuì che la differenza di energia era da attribuire alle caratteristiche chimiche del materiale in analisi. Nel 1930, in seguito a questa scoperta, gli fu conferito il premio Nobel per la Fisica.

1.2 CENNI STORICI

La diffusione Raman della luce da parte delle molecole è stata scoperta per la prima volta da Smekal nel 1923 (Smekal A. Zur, 1923), utilizzando la teoria quantistica classica, e osservata sperimentalmente da Raman e Krishnan nel 1928 (Raman & Krishnan 1928; Das & Agrawal, 2011).

Alla fine degli anni '30 del secolo scorso, l'effetto Raman divenne il principale metodo d'analisi chimica non distruttiva sia per i composti organici che inorganici. La spettroscopia Raman poteva essere applicata non solo ai liquidi ma anche ai gas e ai solidi e, a differenza di altri metodi analitici, poteva essere applicata facilmente per l'analisi di soluzioni acquose.

L'uso della spettroscopia Raman come metodo analitico di base ebbe un declino dopo la seconda guerra mondiale, durante la quale la spettroscopia infrarossa (IR) fu potenziata dallo sviluppo di rivelatori sensibili e dai progressi nell'elettronica; le misure di spettroscopia IR divennero rapidamente operazioni di routine, mentre le

misure di spettroscopia Raman richiedevano ancora operatori esperti e camere oscure.

Dagli inizi degli anni '60 del secolo scorso, con l'introduzione dell'uso del laser, questa tecnica analitica ritornò in auge. Venne risolto, infatti, il problema della monocromaticità e intensità della radiazione eccitatrice, limiti per i quali la spettroscopia Raman era stata messa da parte.

Dalla fine degli anni '80, furono commercializzati spettrofotometri Raman a trasformata di Fourier (FT-Raman) per molti scopi analitici, come il controllo di processi di produzione in industrie petrolchimiche e farmaceutiche, analisi di materiale nucleare, ecc.

1.3 LA TEORIA DELLO *SCATTERING* RAMAN

La spettroscopia Raman è una spettroscopia di tipo vibrazionale ed è basata sul processo di diffusione Raman.

Quando si considera lo *scattering* Raman, si possono dare due interpretazioni: quella classica e quella quantistica. Nel primo caso, la luce è considerata una radiazione elettromagnetica, che contiene un campo elettrico oscillante che interagisce con una molecola attraverso la sua polarizzabilità.

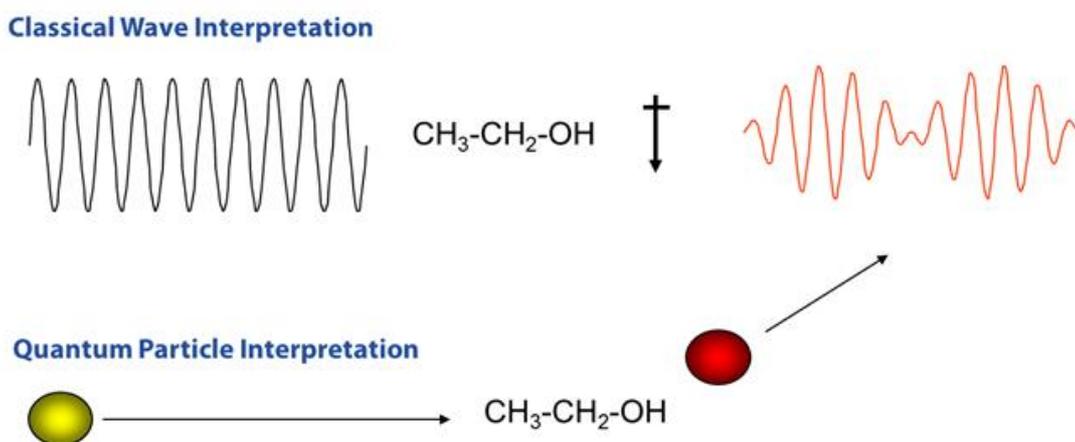


Figura 1: rappresentazione dell'interpretazione classica e quantistica dello *scattering* Raman.

Quando si considera l'interpretazione quantistica, invece, la luce è pensata come un fotone che colpisce la molecola e poi si disperde in modo anelastico. In questa interpretazione, il numero di fotoni sparsi è proporzionale alla dimensione del legame.

Per spiegare l'effetto Raman, è più facile iniziare con l'interpretazione classica, considerando una semplice molecola biatomica come una massa su una molla dove m rappresenta la massa atomica, x rappresenta lo spostamento e K rappresenta la forza del legame.

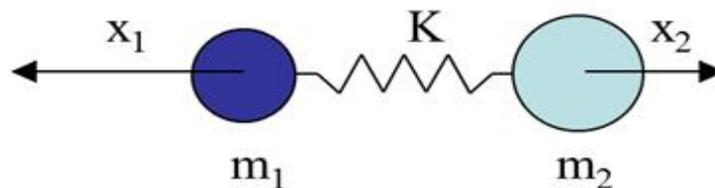


Figura 2: raffigurazione dell'effetto Raman.

Lo spostamento della molecola può essere espresso utilizzando la legge di Hooke come:

$$\frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \left(\frac{d^2 x_1}{dt^2} + \frac{d^2 x_2}{dt^2} \right) = -K(x_1 + x_2).$$

Equazione 1

Sostituendo la massa ridotta (m_1 e $m_2 / [m_1 + m_2]$) con μ e lo spostamento totale ($x_1 + x_2$) con q , l'equazione può essere semplificata a:

$$\mu \frac{d^2 q}{dt^2} = -Kq,$$

Equazione 2

Risolviendo questa equazione per q otteniamo:

$$q = q_o \cos(2\pi\nu_m t),$$

Equazione 3

dove m è la vibrazione molecolare ed è definita come:

$$\nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}}.$$

Equazione 4

Dalle equazioni 3 e 4, è evidente che la molecola vibra secondo uno schema coseno con una frequenza proporzionale alla forza del legame e inversamente proporzionale alla massa ridotta. Da ciò si può dedurre che ogni molecola ha le sue frequenze vibrazionali e che queste sono determinate non solo dagli atomi nella molecola, ma anche dalle caratteristiche dei singoli legami.

Queste frequenze vibrazionali possono essere misurate attraverso l'effetto Raman.

La polarizzabilità di una molecola (α) è in funzione dello spostamento (q). Quando la luce incidente interagisce con una molecola, induce un momento di dipolo (P), pari a quello del prodotto della polarizzabilità della molecola e del campo elettrico della sorgente luminosa incidente. Questo può essere espresso come:

$$P = \alpha E_o \cos(2\pi\nu_o t),$$

Equazione 5

dove E_o è l'intensità e ν_o è la frequenza del campo elettrico. Usando l'approssimazione di piccola ampiezza, la polarizzabilità può essere descritta come una funzione lineare dello spostamento:

$$\alpha = \alpha_o + q \left(\frac{\partial \alpha}{\partial t} \right)_{q=0} + \dots,$$

Equazione 6

che quando combinato con le equazioni 3 e 5 risulta:

$$P = \alpha_o E_o \cos(2\pi\nu_o t) + q_o \cos(2\pi\nu_m t) E_o \cos(2\pi\nu_o t) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial t} \right)_{q=0}$$

Equazione 7

Nell'equazione numero 7 ci sono due effetti risultanti dall'interazione della molecola e della luce incidente. Il primo effetto è chiamato diffusione di Rayleigh, che è l'effetto dominante e non provoca alcun cambiamento nella frequenza della luce incidente. Il secondo effetto è la componente diffusa Raman.

$$q_o E_o \left(\frac{\partial \alpha}{\partial t} \right)_{q=0} [\cos(2\pi\{\nu_o - \nu_m\}t) + \cos(2\pi\{\nu_o + \nu_m\}t)],$$

Equazione 8

L'aumento della frequenza è noto come spostamento anti-Stokes e la diminuzione della frequenza è nota come spostamento Stokes.

Nell'interpretazione quantistica, l'effetto Raman è descritto come diffusione anelastica di un fotone fuori da un legame molecolare. Dal diagramma di Jablonski, mostrato nella figura 3, possiamo vedere che questo effetto risulta dal fotone incidente che eccita la molecola in uno stato energetico virtuale.

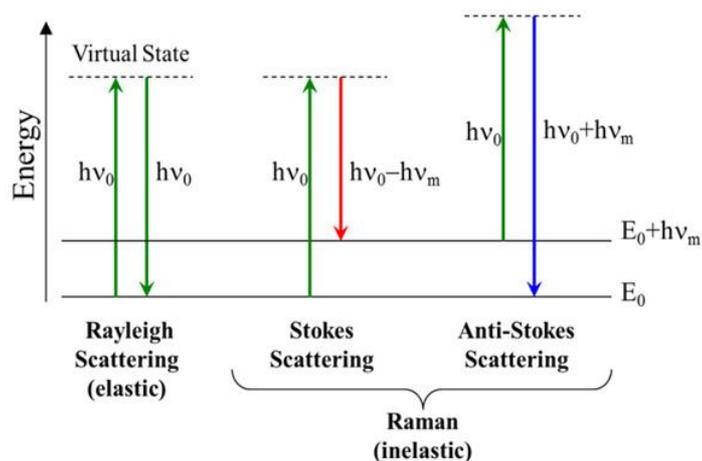


Figura 3: diagramma di Jablonski.

Quando ciò si verifica, si possono osservare tre situazioni:

- 1) la molecola può tornare allo stato fondamentale ed emettere un fotone di energia uguale a quella del fotone incidente (processo elastico di Rayleigh);
- 2) la molecola può emettere un fotone con meno energia del fotone incidente;
- 3) la molecola è già in uno stato eccitato più alto e poi si rilassa di nuovo allo stato fondamentale, emettendo un fotone con più energia del fotone incidente (*scattering* Raman anti-Stokes).

1.4 SPETTROMETRO RAMAN

Lo spettrometro Raman è un apparato che ha la funzione di:

- raccogliere la luce diffusa da un campione irradiato da una sorgente eccitatrice monocromatica;
- scomporre il segnale nelle sue componenti spettrali separandole in frequenza, grazie ad un sistema dispersivo;
- digitalizzare il segnale affinché possa essere visualizzato, ad esempio su un monitor.

Uno spettrometro Raman è costituito da diversi componenti fondamentali:

- 1) una sorgente eccitatrice;
- 2) un sistema per la focalizzazione e la raccolta della radiazione diffusa;
- 3) un sistema di filtraggio della diffusione Rayleigh;
- 4) un apparato dispersivo;
- 5) un rivelatore (fotodiodo CCD o PMT).

Come sorgente di eccitazione, per provocare la diffusione Raman viene utilizzato un laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, cioè “amplificazione della luce per mezzo dell’emissione stimolata di radiazioni”).

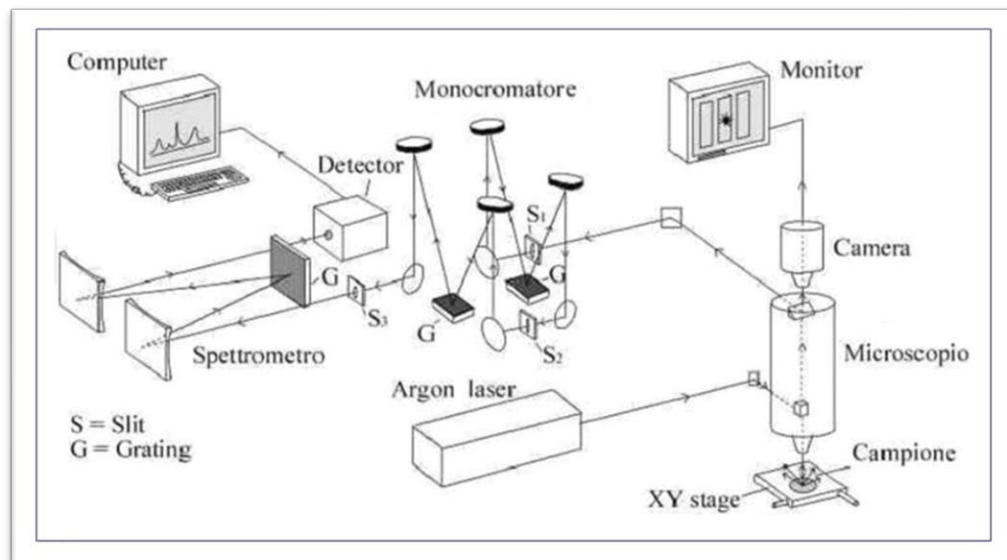


Figura 4 rappresentazione schematica di uno spettrometro Raman dispersivo.

L'energia del laser viene trasmessa al campione e raccolta mediante cavi in fibra ottica. Per eliminare la diffusione Rayleigh e anti-Stokes si utilizza un filtro *edge* o un filtro elimina banda (*notch*). La luce restante, che ha subito diffusione Stokes, viene fatta passare attraverso un elemento di dispersione, in genere un reticolo olografico. Un rilevatore CCD (ad accoppiamento di carica) cattura quindi la luce, producendo lo spettro della diffusione Raman. I laser comunemente utilizzati nella spettroscopia Raman generano radiazioni luminose di diverse lunghezze d'onda che vanno dal vicino ultravioletto (vicino UV) fino al vicino infrarosso (NIR), passando per il visibile (Butler et al., 2016).

I laser ottimali e più frequentemente usati per l'analisi spettroscopica dei campioni biologici hanno una lunghezza d'onda di 1.064 nm o 785 nm. Le molecole d'acqua e il vetro non causano interferenza nei segnali registrati nello spettro, cioè non mascherano la dispersione dei soluti nelle soluzioni, in quanto hanno una sezione

trasversale di dispersione relativamente bassa (Parachalil et al., 2019); la spettroscopia Raman, pertanto, può essere considerata una tecnica ideale per l'analisi di campioni biologici liquidi.

1.5 SPETTRO RAMAN

L'analisi spettroscopica genera un diagramma (spettro); lo spettro che si ottiene fornisce un'impronta digitale (*finger print*) della molecola in esame, permettendone l'identificazione.

Nello spettro Raman si ha in ordinata l'intensità di emissione luminosa e in ascissa la frequenza assoluta in cm^{-1} oppure, più comunemente, lo spostamento Raman o Raman *shift*, cioè la differenza in numeri d'onda tra la radiazione osservata e la radiazione incidente.

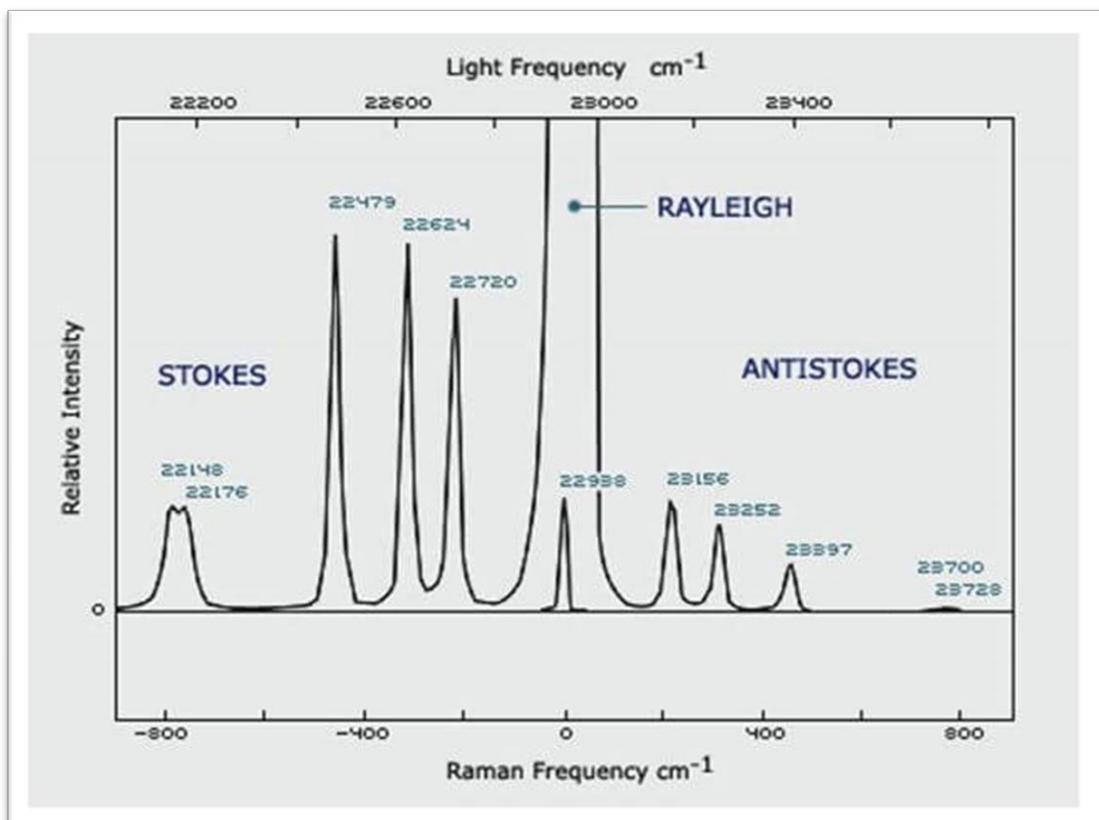


Figura 5: rappresentazione di uno spettro Raman.

Lo spettro è prodotto dalla rilevazione dei fotoni sparsi e contiene i diversi picchi Raman, ciascuno dei quali è caratteristico di uno specifico legame molecolare. Collettivamente, questi picchi forniscono un'“impronta digitale molecolare” intrinseca del campione (lo spettro Raman), risultando in una ricchezza di informazioni sui legami chimici associati alle varie molecole presente nei tessuti e nelle cellule.

Lo spettro Raman presenta una serie di picchi, ciascuno dei quali corrisponde a legami o gruppi funzionali delle molecole all'interno del campione. Lo spettro è caratterizzato da tre tipi di segnale:

- 1) la radiazione *Rayleigh*, la più intensa dello spettro, avente la stessa frequenza della radiazione incidente ed energia pari a ν_0 ;
- 2) le linee *Stokes*, con energia $\nu_0 - \nu_1$, che corrispondono alle interazioni anelastiche da cui originano fotoni con energia inferiore a quella incidente;
- 3) le linee *anti-Stokes*, con energia $\nu_0 + \nu_1$, che corrispondono alle interazioni anelastiche con emissione di fotoni ad energia superiore a quella incidente.

Lo spettro Raman è quindi uno spettro vibrazionale, come lo spettro IR, da cui differisce per due motivi fondamentali:

- a) lo spettro Raman viene generato dalla differenza di due livelli elettronici (la cui differenza è pari ad un livello vibrazionale);
- b) la sorgente dello spettrometro è perciò nel visibile, anche se ora sono molto diffuse sorgenti nel NIR.

Gli spettri Raman ed IR differiscono per le regole di selezione delle transizioni.

Per quanto riguarda i campioni biologici, la regione dello spettro Raman maggiormente significativa è quella compresa tra 400 e 2.000 cm^{-1} e, in particolare:

- la banda compresa tra 1.500 e 1.700 cm^{-1} è associata alle vibrazioni di legame delle proteine;
- le bande centrate a 980, 1.080 e 1.240 cm^{-1} sono legate alla presenza di gruppi fosfati del DNA;
- la banda compresa tra 470 e 1.200 cm^{-1} è associata ai carboidrati;
- infine, la regione compresa tra 2.700 e 3.500 cm^{-1} è indicativa della vibrazione dei gruppi CH, NH e OH nei lipidi e nelle proteine (Butler et al., 2016).

L'intensità di ciascun picco dipende dalla quantità dei suddetti legami o gruppi funzionali.

1.6 APPLICAZIONI

La spettroscopia Raman è ormai considerata una tecnica analitica alla pari della spettroscopia ad infrarossi (Suzuki et al., 2018).

La spettroscopia Raman viene utilizzata a livello industriale per una grande varietà di applicazioni, comprendenti: processi di cristallizzazione, identificazione di polimorfismi, reazioni di idrogenazione, sintesi chimica, biocatalasi e catalasi enzimatica, chimica a flusso, monitoraggio di bioprocessi, reazioni di sintesi.

La spettroscopia Raman offre informazioni spettroscopiche dirette sulla composizione biomolecolare del campione senza o con una preparazione minima. Di conseguenza, possono essere monitorate varie attività intracellulari, come morte cellulare, apoptosi, proliferazione, ecc.

L'applicazione della spettroscopia Raman per caratterizzare i materiali biologici è un campo che ha mostrato una rapida espansione negli anni in vari ambiti di interesse biologico.

In particolare, è nei settori della biologia e della medicina che l'applicazione della spettroscopia Raman ha avuto il maggior sviluppo, in quanto è una tecnica di *imaging* iper-spetttrale chimicamente selettiva che non richiede marcatori fluorescenti.

La spettroscopia Raman è stata applicata anche in farmacologia (Frosch, et al., 2013) e in tossicologia (Owen et al., 2006).

La necessità di una diagnosi sempre più precoce con elevata sensibilità e specificità e la relativa facilità di accesso all'organo da indagare sono requisiti essenziali che spingono i ricercatori a mettere a punto nuove tecniche diagnostiche. La spettroscopia Raman soddisfa molti dei criteri richiesti per l'adozione di una nuova tecnica diagnostica biomedica nella pratica clinica: sensibilità ai cambiamenti nei tessuti, applicazione in vivo con informazioni ottenute in modo non invasivo ed in tempo reale (Hanlon et al., 2000).

Gli spettri Raman consentono di individuare variazioni nella struttura biochimica dei tessuti dovute a processi patologici o all'invecchiamento (Olsztńska-Janus et al., 2012). Infatti, la base dell'applicazione di questa tecnica in campo medico è quella che la progressione di molte patologie causa una variazione nel contenuto molecolare delle cellule che dà luogo ad un diverso *pattern* di segnali.

Un altro importante campo di applicazione è quello oncologico (Auner et al., 2018). La spettroscopia Raman è stata utilizzata per classificare e diagnosticare diverse neoplasie in vari organi: sistema nervoso centrale (Meyer et al., 2011; Desroches et al., 2018), ghiandola mammaria (Haka et al., 2002), vescica (Crow et al., 2004), colon-retto (Lin D et al., 2011), polmone (Huang et al., 2003; Zheng et al., 2020), linfonodi (Horsnell et al., 2012; Lloyd et al., 2013) e apparato riproduttore (Rashid et al., 2014). In questo campo di ricerca, la spettroscopia permette di misurare campioni biologici in modo non distruttivo senza l'uso di *marker* e *in vivo* a seconda della posizione del tumore. La possibilità di indagare istantaneamente senza la

necessità di biopsie è un enorme vantaggio rispetto all'istopatologia, con notevole riduzione dei tempi di diagnosi (Eberhardt et al., 2015).

Oltre agli studi sul cancro, la tecnica è stata impiegata in alcuni studi sulle malattie infettive, come la malaria (Wood & McNaughton, 2006) e la malattia di Lyme (Farber et al., 2021), e per la rilevazione di vari agenti patogeni virali e batterici (Rösch et al., 200; Kloss et al., 2013; Tadesse et al., 2020).

Recentemente, è stata riscontrata una correlazione diretta tra gli spettri Raman e la degenerazione dell'ippocampo, dimostrando che la spettroscopia Raman potrebbe essere un potenziale strumento per il monitoraggio della progressione dell'Alzheimer (Carlomagno et al., 2020).

In campo endoscopico, la spettroscopia Raman potrebbe essere utile per discriminare il tessuto normale da quello patologico, come evidenziato nella patologia dell'esofago di Barrett (Bergholt et al., 2014).

La tecnica è stata applicata con notevoli risultati anche nello studio delle patologie cardiovascolari, in particolare in caso di arteriosclerosi delle arterie coronariche (Buschman et al., 2000; Buschman et al., 2001; Motz et al., 2006, Sćepanović et al., 2011).

La spettroscopia Raman, inoltre, è stata proposta come metodo diagnostico non invasivo per individuare la celiachia (Acri et al., 2021a).

Per quanto riguarda le indagini con applicazione della spettroscopia Raman su sangue intero, emoderivati e cellule che lo compongono, i primi studi hanno avuto inizio negli anni '70 e proseguono tutt'oggi (Atkins et al., 2017). Analisi spettroscopiche Raman dell'emoglobina hanno portato a scoperte molto importanti sulla forma e sulla funzione di questa metalloproteina (Jin et al., 2004). Sono state anche effettuate varie misurazioni per rilevare la saturazione di ossigeno del sangue (Rinia et al., 2004).

Ad oggi, i risultati ottenuti tramite analisi spettroscopica Raman su plasma e siero hanno dimostrato la capacità di rilevare i diversi metaboliti, quali: glucosio (Dou et al., 1996; Berger et al., 1997; Lyandres et al., 2005; Enejder et al., 2005; Lyandres et al., 2008; Ma et al., 2011; Dingari et al., 2011; Shao et al., 2012), colesterolo, trigliceridi, urea, proteine totali, albumina (Qu et al., 1999; Berger et al., 1999; Rohleder et al., 2004; Rohleder et al., 2005; Parachalil et al., 2019), creatinina (Stosch et al., 2005), acido lattico (Pilotto et al., 2001; Hsu et al., 2010), proteina C reattiva (Berghol et al., 2009), ecc.

L'obiettivo finale di molti studi spettroscopici Raman sul sangue intero e i componenti ematici è quello di ottenere un metodo diagnostico rapido ed economico, con l'ulteriore vantaggio che può essere eseguito in modo non invasivo. Per esempio, le attuali ricerche sono volte ad elaborare un'analisi spettroscopica per la misurazione della glicemia in modo non invasivo, transcutaneo, nei pazienti diabetici.

Altre applicazioni biomediche della tecnica Raman sono: analisi della composizione chimica dei composti biologici (DNA, RNA, lipidi, proteine, ecc.), studio delle interazioni tra macromolecole (DNA-proteina, proteina-lipidi), monitoraggio delle funzioni biologiche (assorbimento lipidico, attività enzimatica, funzione neurologica, mappatura dell'ambiente chimico intracellulare).

Molteplici pubblicazioni testimoniano ormai che la spettroscopia Raman può supportare le tecniche *gold standard* e può migliorare la diagnostica clinica in termini di tempo e riduzione dei costi (Eberhardt et al., 2015).

1.6.1 APPLICAZIONI IN MEDICINA VETERINARIA

Nel campo della medicina veterinaria, la spettroscopia Raman è stata utilizzata come strumento diagnostico in tempo reale per la valutazione dei margini in corso di mastectomia (Birtoiu et al., 2016), per differenziare i tessuti malati da quelli sani su

campioni retinici di un gruppo di cani affetti da glaucoma ereditario (Wang et al., 2011) e di altre condizioni neuropatiche dell'occhio (Wang et al., 2013), per identificare le cellule di transizione cancerose nelle urine di cane tramite *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* (SERS) (Pallaoro et al., 2018).

Per quanto riguarda l'uso della metodica nella diagnosi di malattie infettive è stata testata nella toxoplasmosi in gatti domestici per discriminare i campioni negativi da quelli positivi (Duarte et al., 2010). Inoltre, si è tentato di produrre un test immunologico basato sulla tecnica SERS per rilevare tracce di antigeni per il virus West Nile (WNV), il virus della febbre della Valle del Rift (RVFV) e per *Yersinia pestis* (Neng et al., 2018).

Recentemente, è stata valutata tramite spettroscopia Raman la composizione del siero in cavalli atleti per identificare i biomarcatori delle prestazioni sportive (Acri et al., 2021b).

In aggiunta, è stata dimostrata la capacità della spettroscopia Raman come metodo non invasivo, rapido e specifico per eseguire analisi *in situ* di cellule endoteliali aortiche bovine (McManus et al., 2011). Infine, la metodica è stata utilizzata per il sessaggio nelle galline ovaiole (Galli et al., 2016).

1.7 VANTAGGI E LIMITI DELLA SPETTROSCOPIA RAMAN PER LO STUDIO DELLE MOLECOLE BIOLOGICHE

La spettroscopia Raman è una tecnica non distruttiva, non invasiva, con danno del campione minimo o praticamente assente. Spettri a bassa temperatura minimizzano gli eventuali danni causati al campione dal riscaldamento locale indotto dal laser. Molto utile è la possibilità di analizzare volumi molto piccoli di soluzione (da 5 a 30 μ l).

La specificità chimica senza l'uso di *marker*, la non invasività e l'ottima risoluzione spaziale sono i principali vantaggi delle tecniche basate sullo *scattering* Raman.

La tecnica Raman, tra le metodologie spettroscopiche utilizzate per supportare la diagnostica medica, è l'unica ad offrire informazioni spettroscopiche dirette sulla composizione biomolecolare del campione senza che sia necessaria una preparazione laboriosa del campione stesso.

Gli svantaggi della tecnica, di contro, sono legati alla debolezza del segnale e alla limitata profondità di penetrazione.

Per affrontare queste limitazioni, con lo scopo di aumentare l'intensità del segnale di *scattering*, sono state sviluppate negli anni diverse tecniche Raman: ne esistono ormai 25 diversi tipi (Jones et al., 2019).

Un esempio è quello di scegliere la lunghezza d'onda di eccitazione all'interno della banda di assorbimento di una certa molecola. In questo caso il processo è chiamato *Resonance Raman Scattering* (RRS).

Altre tecniche consentono un'ulteriore amplificazione del segnale Raman. In particolare: *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering* (CARS), in cui la radiazione di due laser è incidente sul campione e l'intensità dell'energia dell'onda uscente dà informazioni sui modi vibrazionali del campione; *Stimulated Raman Scattering* (SRS), in cui lo *scattering* Raman ottenuto con un laser fuoriesce davanti al campione, nella stessa direzione oppure con un piccolo angolo rispetto alla radiazione del laser incidente.

Capitolo 2

LA LEISHMANIOSI

2.1 INTRODUZIONE

La leishmaniosi è una zoonosi parassitaria trasmessa da vettori e causata da protozoi flagellati del genere *Leishmania* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae).

La leishmania è un parassita eteroxeno e, nell'arco della sua vita, colonizza due tipi di ospiti: i mammiferi, dove vive nei fagociti del sistema reticolo-endoteliale, e i flebotomi, di cui colonizza l'intestino; tuttavia, anche *Forcipomyia* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) e alcune specie di zecche sono state segnalate come potenziali vettori di *Leishmania* sp. (Dantas-Torres et al., 2010; Solano-Gallego et al., 2012; Slamaet al., 2014).

Il parassita viene trasmesso ai mammiferi da insetti vettori appartenenti al genere *Phlebotomus*, ordine Diptera, sottordine Nematocera, famiglia Psychodidae, sottofamiglia Phlebotominae. Attualmente, i vettori appartenenti ai Phlebotominae vengono suddivisi in tre generi del Vecchio Mondo (*Phlebotomus* [13 sottogeneri], *Sergentomyia* [dieci sottogeneri] e *Chinius* [quattro specie]) e tre del Nuovo Mondo (*Lutzomyia* [26 sottogeneri e gruppi], *Brumptomyia* [24 specie] e *Warileya* [6 specie]) (Galati 2003; Seccombe et al., 1993)

La malattia rappresenta un importante problema di salute pubblica in America, Africa, Bacino del Mediterraneo, regioni occidentali e sud-orientali dell'Asia e Australia. La malattia è assente in Nuova Zelanda e nel Sud del Pacifico (www.who.int)

In Italia, per quanto riguarda la leishmaniosi canina, si è assistito negli ultimi anni ad un aumento della sua incidenza e diffusione geografica ad aree ritenute indenni (Poglayen et al, 1997, Rossi et al., 1999, Ferroglia et al., 2002, Maroli et al., 2008, Baldelli et al. 2011). Infatti, da aree tradizionalmente endemiche, quali Centro e Sud

Italia e isole maggiori, l'infezione si è espansa in molte aree collinari prealpine e pre-appenniniche del Nord Italia. Un recente studio epidemiologico condotto tra la fine del 2019 e l'inizio del 2020 denominato "Leishmania 2020" (Gradoni et al., 2021), svolto dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Veterinaria di Napoli e supportato dalla multinazionale farmaceutica Bayer, ha confermato la presenza di focolai autoctoni anche in Valle d'Aosta, Piemonte, Lombardia, Veneto, Trentino-Alto Adige e Friuli-Venezia Giulia. Gli esperti hanno inoltre prospettato in futuro un'ulteriore espansione della malattia verso nord, nelle aree che sono compatibili con la presenza del vettore. Come principale causa di questo fenomeno sono indicati i cambiamenti climatici responsabili dell'innalzamento delle temperature, che ha reso quasi tutte le regioni italiane compatibili con la presenza dei vettori della malattia. La diffusione del protozoo, inoltre, è stata favorita dal fenomeno del randagismo e dalla maggiore mobilità dei cani, soprattutto durante il periodo estivo.

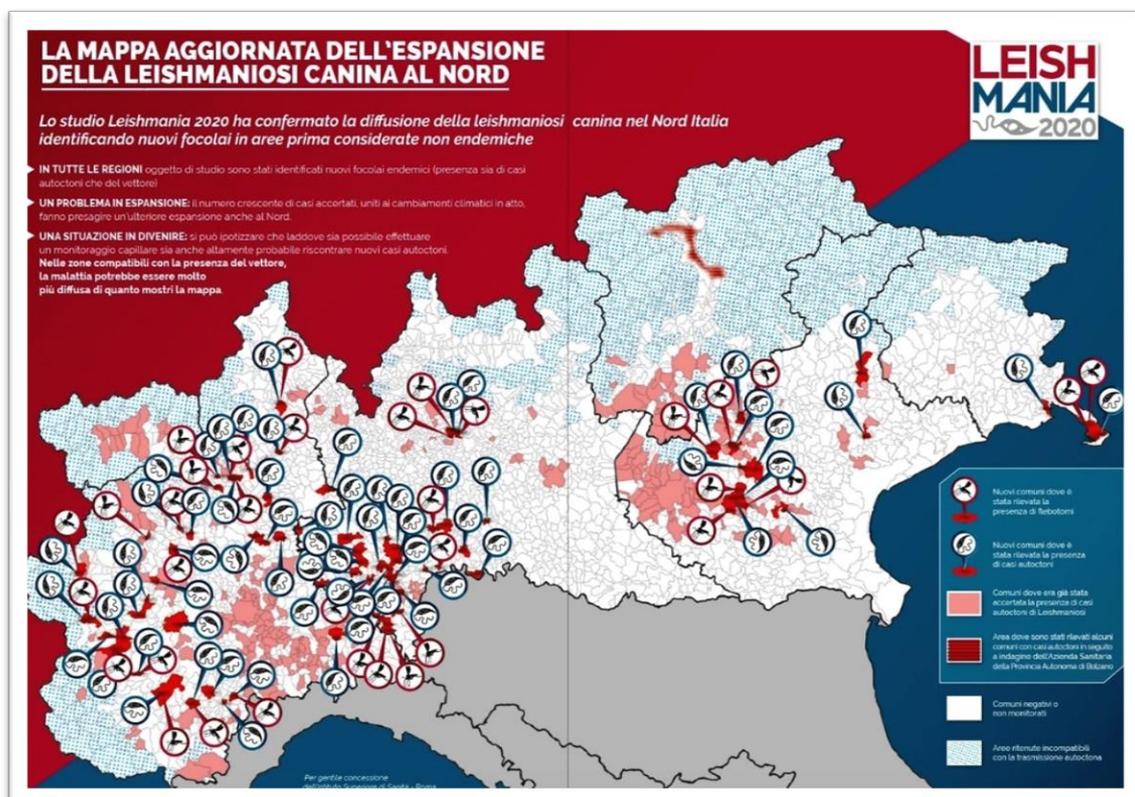


Figura 6: Diffusione della leishmaniosi canina nel Nord Italia (Gradoni et al., 2021).

2.2 CLASSIFICAZIONE: CENNI STORICI

La conoscenza dell'origine della leishmania e dei flebotomi, così come la comprensione delle loro relazioni evolutive, è di fondamentale importanza per poter fare previsioni future dei modelli di trasmissione della malattia e della sua epidemiologia e sviluppare strategie di intervento e controllo (Akhoundi et al., 2016).

L'origine e la diffusione del parassita risale all'epoca preistorica, come dimostrato da reperti fossili dai quali è stato possibile isolare il patogeno (Steverding, 2017).

Uno studio di paleontologia molecolare ha stabilito che la leishmaniosi viscerale era già presente nell'antico Egitto: il DNA mitocondriale del parassita, infatti, è stato isolato in quattro esemplari di mummie egizie del 2050-1650 aC (Zink et al., 2006). Inoltre, in alcuni papiri del 1500 aC era descritta una forma cutanea denominata 'bottone del Nilo' riconducibile alla leishmaniosi cutanea.

Nel Medioevo, alcuni studiosi arabi descrissero numerosi casi di leishmaniosi cutanea (Edrissian et al., 2016).

Nel 1756, il medico Alexander Russel descrisse dettagliatamente forme secche ed umide della piaga orientale.

Nel 1827, il chirurgo militare William Twining, in servizio in India, descrisse casi clinici di pazienti che presentavano aspetto emaciato, splenomegalia, anemia acuta e febbre intermittente.

Alla fine del 1800, un medico dell'esercito russo riconobbe che l'agente eziologico all'interno di alcune lesioni cutanee era un protozoo, ma questa scoperta rimase senza seguito (Hoare, 1938).

All'inizio del ventesimo secolo, gli studiosi Leishman e Donovan isolarono, nella milza di alcuni pazienti deceduti in India, dei corpi ovoidali. Ronald Ross riconobbe

tali elementi come una nuova specie di protozoo, denominandola *Leishmania donovani* (Steeverding, 2017).

Nel 1904, Cathoire e Laveran identificarono *Leishmania* sp. in bambini con anemia splenica infantile e per tale motivo, nel 1908, Nicolle denominò il parassita *Leishmania infantum*. Nello stesso anno, a Tunisi, insieme al collega Comte, identificò il serbatoio nel cane, che da allora è riconosciuto come il principale *reservoir* per la leishmaniosi viscerale (Nicolle & Comte 1908). Contestualmente, il patologo americano Wright scoprì nel 1903 l'agente eziologico della leishmaniosi cutanea; nel 1906, il tedesco Lühe diede a questo il nome di *Leishmania tropica*.

Nei primi anni 40, Swaminath, Shortt ed Anderson in India e Adler e Ber in Palestina dimostrarono la trasmissione di *L. donovani* e *L. tropica* mediante i flebotomi. Adler, infatti, riuscì a trasmettere la malattia in cinque volontari dopo puntura da parte di flebotomi infettati sperimentalmente in laboratorio con *L. tropica*. (Steeverding, 2017).

Successivamente, si scoprì che il flebotomo implicato nella trasmissione della leishmaniosi era del genere *Lutzomyia*.

I protozoi del genere *Leishmania* appartengono al phylum Sarcomastigophora, ordine Kinetoplastida, famiglia Tripanosomatidae. Il genere comprende due sottogeneri, *Leishmania* (*Leishmania*) parassiti del Nuovo e Vecchio Mondo e *Leishmania* (*Vianna*), parassiti del Nuovo Mondo.

La classificazione in specie e sottospecie di *Leishmania* era inizialmente basata sulla distribuzione geografica della malattia e sul quadro clinico, individuando così tre principali forme di leishmaniosi umana: leishmaniosi viscerale (LV), leishmaniosi cutanea (LC) e leishmaniosi mucocutanea (LMC).

La leishmaniosi viscerale e quella cutanea erano distribuite nel Vecchio e Nuovo Mondo, mentre la forma mucocutanea era prevalentemente limitata alle Americhe.

Nel 1987, Lainson e Shaw proposero una classificazione in base alla posizione del protozoo all'interno dell'intestino del vettore.

Con l'introduzione dell'analisi elettroforetica degli isoenzimi negli anni '70 e l'ibridazione del DNA nei primi anni '80, la classificazione è stata meglio definita, dimostrando che i criteri patologici e geografici erano inadeguati.

L'uso di queste tecniche molecolari ha portato alla pubblicazione di uno schema tassonomico da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS, 1990).

Una classificazione del 1990 di Rioux e collaboratori si basa su tali caratteri biochimici: le unità tassonomiche elementari sono costituite da ceppi che presentano lo stesso profilo enzimatico (zimodema), mediante la *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE). Ogni zimodema è composto da ceppi che presentano la stessa mobilità elettroforetica di un certo numero di enzimi (WHO 2010) e 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). *L. donovani* e *L. tropica* presentano un elevato polimorfismo enzimatico e genetico, mentre *L. infantum* è una specie piuttosto uniforme: quasi tutti gli isolati appartengono allo zimodema MON 1 e MON 72 (Pratlong et al., 2004).

Attualmente, la MLEE costituisce il *gold standard* per l'identificazione e la classificazione dei ceppi isolati di *Leishmania* spp..

Recentemente è stato proposto l'utilizzo della *Multilocus Microsatellite Typing* (MLMT). Studi di genetica di popolazione condotti attraverso questo esame hanno rivelato una struttura di popolazione gerarchica nei complessi *L. tropica*, *L. major* e *L. donovani*.

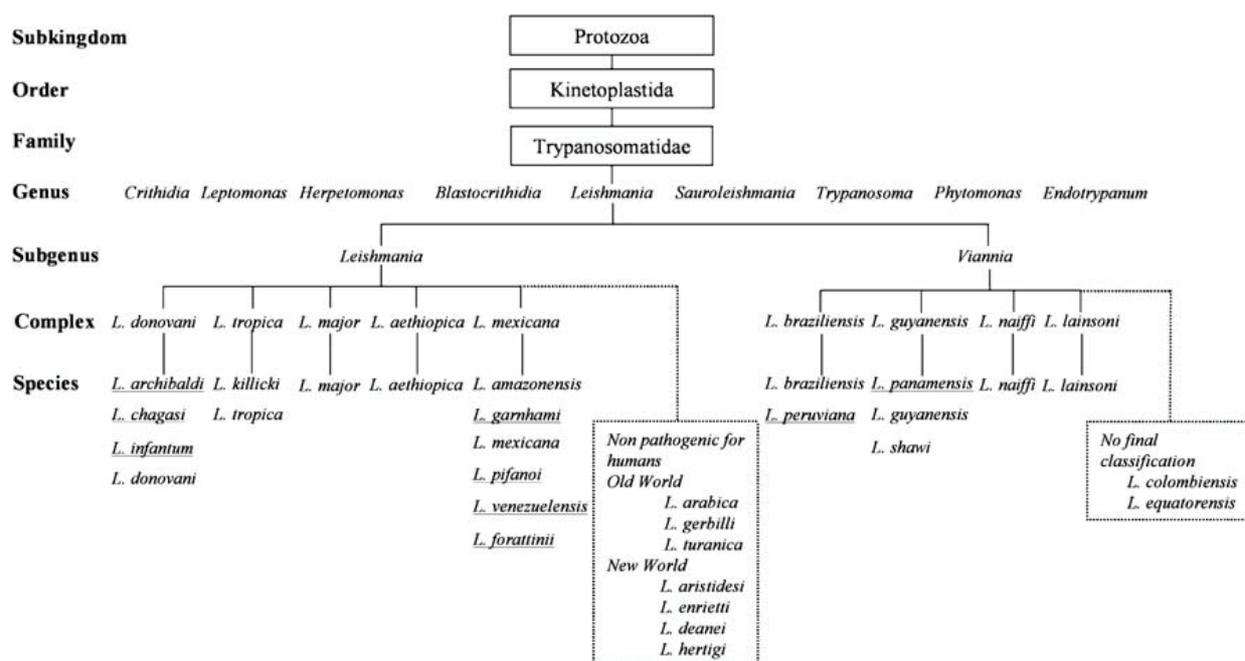


Figura 7: tassonomia di *Leishmania* spp. World Health Organization (WHO, 1999).

2.3 SPECIE DI *LEISHMANIA* DI INTERESSE MEDICO

Oggi sono note 53 specie di *Leishmania* e circa 20 sono patogene per l'uomo (Bañuls et al., 2007; Akhoundi et al., 2016). La leishmaniosi è endemica in Asia, Medio Oriente, Nord Africa, Mediterraneo e America Meridionale e Centrale. È diffusa in 89 Paesi e in tutto il mondo si verificano da 1,5 a 2 milioni di nuovi casi ogni anno. La leishmaniosi può causare malattie mucocutanee o viscerali ed è causa di circa 70.000 decessi all'anno. (Maxfield & Crane 2021).

Come detto, si distinguono tre forme morbose di leishmaniosi umana, in base alla distribuzione geografica, alla specie di *Leishmania* coinvolta ed all'immunocompetenza dell'ospite: forma viscerale; forma cutanea; forma mucocutanea.

La leishmaniosi viscerale – causata da *L. donovani* complex –, nota anche come *kala-azar*, febbre dumdum o febbre nera, si presenta frequentemente con andamento cronico e può riattivarsi in soggetti immunodepressi dopo 2-4 mesi di incubazione. La forma promastigote migra verso il sistema dei fagociti mononucleati; i segni

clinici sono febbre, perdita di peso, epatosplenomegalia, linfadenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia, dissenteria. Spesso la malattia non risponde alla terapia, rendendo la prognosi infausta.

La leishmaniosi cutanea, o bottone d'oriente o bolla di Delhi, si manifesta dopo 1-2 mesi di incubazione, con lesioni nodulari rossastre che possono ulcerare nel punto di inoculo. Quando ulcerata, la lesione diviene rosso-bluastro, crateriforme, dolente, con conseguente infezione batterica secondaria. Si riscontra linfadenomegalia a carico delle ghiandole prossime alla lesione cutanea. Sebbene la malattia sia autolimitante, le lesioni comportano esiti cicatriziali deturpanti.

La leishmaniosi mucocutanea, o *espundia*, causata da *L. braziliensis* complex, è una conseguenza della forma cutanea che può manifestarsi anche a distanza di anni dopo la guarigione; causa edemi ed infezioni batteriche secondarie molto gravi, che producono lesioni deturpanti e mutilazioni.

2.4 IL VETTORE

I vettori responsabili della trasmissione della leishmaniosi sono piccoli insetti ematofagi appartenenti ai generi *Lutzomyia* e *Phlebotomus* e vengono classificati nel phylum Arthropoda, classe Insecta, ordine Diptera, sottordine Nematocera, famiglia Phlebotomidae.

I flebotomi, o pappataci, sono di colore giallo pallido con dimensioni tra 2 e 4 mm e presentano le seguenti caratteristiche: fitta peluria sul corpo, testa allungata con occhi voluminosi e di colore scuro posizionati sui lati; palpi ricurvi e coperti di pelo; la proboscide corta e rivolta verso il basso; ali di forma subovale, grandi e pelose; zampe lunghe ed esili. I maschi sono riconoscibili per i segmenti genitali molto sviluppati e la mancanza di apparato pungitore; sono mellifagi e si nutrono di succhi vegetali. Le femmine sono invece ematofaghe e hanno strutture buccali adatte a perforare la cute.

Hanno attività crepuscolare e notturna; il volo è silenzioso e di breve durata. Dopo l'accoppiamento, le femmine depongono le uova in nicchie ecologiche, generalmente dove sono state deposte altre uova. Lo sviluppo delle larve necessita di temperatura costante, buio e un certo grado di umidità.

Il flebotomo è un dittero con ciclo olometabolo, ovvero che compie una metamorfosi completa.

La femmina necessita di un pasto di sangue per completare il ciclo di produzione delle uova. Il bolo alimentare, costituito dalle cellule del sangue avvolte dalla membrana peritrofica, viene digerito e assimilato in modo da permettere la maturazione delle uova nel follicolo ovarico. Il ciclo si completa in 5-8 giorni e vengono prodotte dalle 30 alle 60 uova. Le uova sono di forma allungata di grandezza 0,3–0,4 mm. La schiusa delle uova si ha tra 4 e 20 giorni e si susseguono quattro stadi larvali in 30-60 giorni. Si ha poi il periodo della pupa, che dura circa 7 giorni, fino ad arrivare alla forma adulta, la cui durata di vita varia dalle 2 alle 6 settimane (Munstermann, 2004).

Nel sito dove la femmina effettua il pasto di sangue può manifestarsi una lesione cutanea pruriginosa che si trasforma in papula e permane per alcune settimane.

In Italia, sono presenti sette specie appartenenti al genere *Phlebotomus*: *P. perniciosus*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus* (= *P. major s.l.*), *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. mascittii*. Le specie più abbondanti e diffuse nel nostro Paese sono *P. perniciosus*, *P. perfiliewi* e *Sergentomya minuta* (Maroli et al., 1994; Maroli & Khoury, 1998). La prima è la specie predominante, presente nella maggior parte delle nostre regioni, con densità elevate nelle aree della costa tirrenica e ionica, in Sicilia e Sardegna (Gramiccia et al., 2013).

P. neglectus in passato era presente solo nelle regioni del Sud ma attualmente sono stati identificati diversi focolai anche in Valle d'Aosta, Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli-Venezia Giulia.

P. ariasi è una specie limitata a pochi focolai in Liguria, nelle province di Imperia e Savona, e in Piemonte, nel Cuneese.

P. papatasi è una specie solitamente refrattaria all'infezione da *Leishmania infantum*, sebbene sia stata riscontrata una certa positività nel Sud Italia (Latrofa et al., 2018).

P. perfiliewi è largamente diffusa nella regione Emilia-Romagna, con una presenza di *Leishmania* tra il 6% e il 10% che sembra essere correlata alla forma VL umana, differendo invece dal ceppo canino (Calzolari et al. 2019).

2.5 LA LEISHMANIOSI CANINA (*L. infantum*)

La leishmaniosi canina (LCan) è una metazoonosi protozoaria che nel cane si identifica con una immunopatologia cronica ingravescente e incurabile (Poglayen, 2014); è causata da *Leishmania infantum*.

I cani infetti costituiscono il principale serbatoio domestico del parassita e svolgono un ruolo chiave nella trasmissione all'uomo. Il controllo della malattia umana dipende da un efficace controllo della leishmaniosi canina.

La leishmaniosi canina esiste in circa 50 Paesi, interessando principalmente tre focolai: Cina, Bacino del Mediterraneo e Brasile.

2.5.1 TRASMISSIONE

Affinché si mantenga la sopravvivenza del parassita, questo deve avere un serbatoio d'infezione in cui riprodursi e l'opportunità di diffondere ad altri ospiti suscettibili attraverso la presenza nel territorio del vettore.

La trasmissione avviene comunemente con il morso di flebotomi; ad oggi non è ancora dimostrato del tutto che altri artropodi siano in grado di veicolare la leishmania.

Molti studi hanno segnalato la trasmissione dell'infezione per via sessuale nel cane (Riera & Valladares, 1996; Rosypal et al., 2005; Silva et al., 2009; Ben Slimane et al., 2014; Naucke et al.; Lorentz, 2016).

La trasmissione verticale è stata segnalata in tutto il mondo (Mancianti & Sozzi, 1995; Di'az-Espineira & Slappendel, 1997; Boggiatto et al., 2011; Vida et al., 2016; Grinnage-Pulley et al., 2016; Salantet al., 2021; Toepp et al., 2017; Wright & Moral-Gant 2020) e la malattia che ne deriva si presenta con segni clinici simili a quelli osservati nella malattia trasmessa da vettore (Gibson-Corley et al., 2008); i fattori di rischio associati a questa via di trasmissione, tuttavia, non sono stati ancora identificati (Toepp et al., 2020).

È stato dimostrato che la trasmissione può avvenire anche tramite trasfusione di sangue ed emoderivati infetti (Owens et al., 2001; Giger et al., 2002; De Freitas et al., 2006; Riera et al., 2008; Tabar et al, 2008).

Altra via di trasmissione sospettata è quella diretta tra cani attraverso morsi o ferite cutanee (Karkamo et al., 2014; Naucke et al., 2016).

I serbatoi dell'infezione includono cani, roditori e altri mammiferi. Ad oggi, più di 70 specie di mammiferi e rettili sono state identificate come serbatoi per leishmaniosi.

Negli ultimi anni, sono stati segnalati casi di leishmaniosi in gatti di zone endemiche di Europa, Asia e America Latina.

La leishmaniosi felina (FeL) è una malattia emergente, con una prevalenza complessiva stimata del 10%. I casi vengono ormai segnalati di frequente. Un alto tasso di sieroprevalenza (12%) di FeL si trova nei paesi dell'Europa meridionale, tra cui Italia, Spagna, Portogallo e Grecia. Nelle regioni endemiche come i Paesi mediterranei, la forma subclinica di infezione da *L. infantum* nel gatto è comune, mentre la malattia clinica è relativamente rara (Pennisi & Persichetti 2018; Asfaram et al., 2019). Nel Nord Italia, è stata riscontrata una sieroprevalenza fino al 12,2% nei gatti randagi (Spada et al., 2013; 2016; Iatta et al., 2019).

Per quanto riguarda l'infezione da leishmania negli altri animali domestici esistono diverse segnalazioni. Sono stati riferiti casi di leishmaniosi cutanea da *L. infantum* nei cavalli in Europa meridionale e nel Sud della Germania (Gazzoni et al., 2020).

In America Latina, sono stati segnalati casi di leishmaniosi cutanea in muli, asini e cavalli (Escobar et al., 2019; Mhadhbi & Sassi, 2020).

La prima descrizione di un caso di leishmaniosi in un furetto domestico è stata in Spagna (Giner et al., 2020).

L'infezione da *L. infantum* è sempre più segnalata anche nella fauna selvatica di tutto il mondo (Azami-Conesa et al., 2021), Europa compresa (Dipineto et al., 2007, Karayiannis et al., 2015, Azami-Conesa et al., 2021). In Sicilia, *L. infantum* è stata diagnosticata tramite qPCR nel 5,4% degli animali selvatici esaminati (conigli e volpi rosse) (Abbate et al., 2019).

Essere a conoscenza del ruolo degli animali selvatici come ospiti o serbatoi di *Leishmania* spp. è essenziale per applicare misure di controllo e programmi di monitoraggio (Azami-Conesa et al., 2021).

2.5.2 EPIDEMIOLOGIA

La leishmaniosi canina è molto diffusa sia nel Vecchio che nel Nuovo Mondo. In Europa, LCan è maggiormente diffusa nel Bacino del Mediterraneo, ma nell'ultimo decennio si è diffusa anche verso il nord del Paese (Dantas-Torres et al., 2012). In Sud America, LCan si sta espandendo verso sud fino alle regioni settentrionali dell'Argentina e meridionali del Brasile, al Paraguay e all'Uruguay (Marcondes 2019). Le ragioni dell'espansione della leishmaniosi canina possono essere legate al movimento incontrollato dei cani, all'insediamento di popolazioni di flebotomi permanenti in aree precedentemente esenti, nonché all'inefficacia delle attuali strategie di controllo. A questo proposito, l'abbattimento dei cani sieropositivi è stato a lungo raccomandato come mezzo per diminuire la prevalenza dell'infezione nei

cani e, quindi, l'incidenza di VL. Nel corso degli anni, milioni di cani positivi a *L. infantum* sono stati sottoposti ad eutanasia per il controllo della VL umana. Le politiche nazionali di sanità pubblica di numerosi paesi di Asia Centrale, Caucaso, Balcani, Cina (aree rurali), Nord Africa (Maghreb) e Medio Oriente raccomandano ancora di abbattere qualsiasi cane positivo per *L. infantum* (Alvar et al., 2012). In Centro e Sud America, sebbene sia consentito l'approccio terapeutico per i cani di proprietà, l'abbattimento dei cani serbatoio è raccomandato e praticato.

Negli ultimi 20 anni, una raccolta di dati provenienti da tutto il mondo ha dimostrato il fallimento di questa strategia di controllo. L'abbattimento dei cani non è supportabile in quanto, oltre al fatto che non ci sono prove scientifiche a sostegno dell'efficacia di tale sistema di controllo, esistono ospiti serbatoio alternativi alla specie canina, che possono svolgere un ruolo attivo nel mantenimento del ciclo di vita di *L. infantum*. Inoltre, i cani abbattuti vengono presto sostituiti con cani giovani che sono spesso più suscettibili all'infezione primaria. Infine, un controllo efficace della trasmissione di *L. infantum* richiede approcci integrati incentrati non solo sul cane come fonte indiretta, ma anche sul parassita e, soprattutto, sul vettore. Pertanto, l'impiego dell'abbattimento dei cani come strategia per ridurre l'incidenza di VL nell'uomo non può essere giustificato e non dovrebbe più essere utilizzato (Dantas-Torres et al., 2019).

In Italia, fino agli anni '80 tutte le regioni del Nord Italia, esclusi alcuni territori della provincia di Bologna, erano indenni da LCan (Pozio et al., 1985). Dagli inizi degli anni '90, si è verificato un aumento dell'incidenza di LCan in tutte le regioni endemiche e sono stati segnalati microfocolai anche in aree tradizionalmente non endemiche, quali quelle di Piemonte, Valle d'Aosta, Lombardia, Trentino-Alto Adige, Veneto e Friuli-Venezia Giulia (Capelli et al., 2004; Rossi et al., 2005). La Provincia autonoma di Bolzano-Alto Adige, può essere considerata un territorio a bassa endemicità di LCan, poiché la maggior parte dei cani testati ha mostrato un titolo anticorpale al livello soglia di 1:40, suggerendo un basso grado di trasmissione/contatto con il parassita (Morosetti et al., 2020).

In definitiva, l'infezione riguarda ormai tutte le aree del nostro Paese, anche quelle che in passato erano considerate indenni. Infatti, dall'ultimo studio epidemiologico (2019-2020) è risultato che in tutte le regioni investigate, comprese quelle ritenute indenni, si è evidenziata una diffusione sempre maggiore dei flebotomi vettori della patologia (Gradoni et al., 2021).

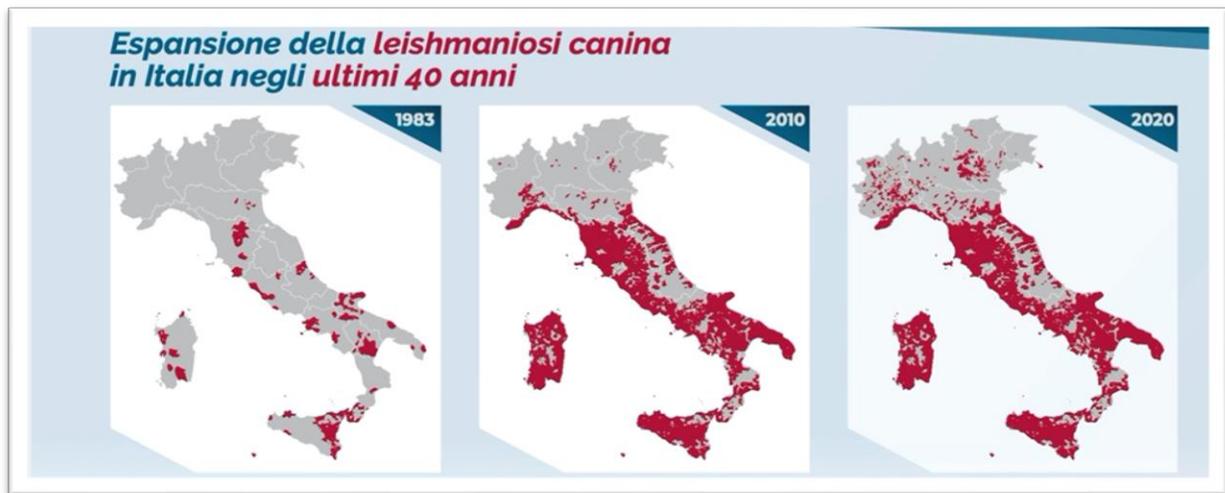


Figura 8: diffusione della leishmaniosi canina in Italia (Gradoni et al., 2021).

2.5.3 MORFOLOGIA DEL PARASSITA

Le leishmanie sono parassiti unicellulari, dicensi e dimorfici, in quanto nel ciclo vitale hanno due forme differenti: una immobile, intracellulare (amastigote), nell'ospite definitivo (mammifero vertebrato) e una flagellata mobile, extracellulare (promastigote), nell'ospite intermedio (flebotomo).

L'amastigote è la forma infettante del mammifero; è intracellulare obbligata e si localizza nelle cellule del sistema dei fagociti mononucleati (SFM) degli ospiti vertebrati; ha un corpo rotondo, globoso, immobile di dimensioni 2-5 μm x 2-3 μm ; presenta un grosso nucleo centrale o eccentrico (kinetoplasto), ovvero DNA extranucleare con forma bastoncellare situato alla periferia della cellula, e un residuo del corpo basale, dopo la perdita del flagello.

Le forme che infettano il flebotomo sono il promastigote e il paramastigote. Il promastigote è un microrganismo extracellulare che si localizza nel tubo digerente degli insetti vettori. Presenta una forma allungata a pera, di lunghezza 5-24 μm , con il kinetoplasto anteriore al nucleo e un flagello nella parte anteriore della cellula. Il paramastigote è più ovalare e presenta il kinetoplasto laterale (Munstermann, 2004). La possibilità di nuotare liberamente da parte di promastigote e paramastigote li definisce come forme “nectomonadi”, a differenza delle forme attaccate all'intestino crasso del flebotomo che sono nominate “aptomonadi” (Walters, 1993).

2.5.4 CICLO BIOLOGICO

Il ciclo biologico di *L. infantum* inizia con un pasto di sangue da parte del flebotomo su un cane infetto e l'ingestione dell'amastigote. Nell'apparato digerente del vettore, l'agente patogeno assume la forma flagellata infettiva (promastigote), che viene reinoculata nella cute dell'ospite vertebrato con il pasto di sangue successivo, ricominciando così il ciclo. (Kaye e Scott, 2011; Laskay *et al.*, 2003). Nel canale alimentare del flebotomo, gli amastigoti evolvono in forme extracellulari quali promastigoti e paramastigoti, diventando forme mature nel giro di tre giorni (Munstermann, 2004). A questo punto, la forma flagellata si ancora ai microvilli intestinali (forma “aptomonade”); successivamente, in sei giorni, passa dall'intestino medio all'intestino primitivo fino all'apparato buccale e si localizza nelle ghiandole salivari; da qui, verrà poi rilasciata con il pasto di sangue nell'ospite definitivo. La saliva, oltre a contenere le leishmanie metacicliche infettanti, è ricca di sostanze che agevolano il pasto di sangue (sialogenine), essendo dotate di attività anti-emostatica, antinfiammatoria e immunomodulatrice (Lestnova *et al.*, 2017; Telleria *et al.*, 2018). Il contenuto salivare favorisce l'elusione dei sistemi di protezione della cute che altrimenti ostacolerebbero la possibilità di nutrirsi da parte del flebotomo.

Recentemente, è stato rivalutato il ciclo biologico di *L. infantum*, scoprendo che i promastigoti metaciclici che non vengono trasmessi nell'ospite mammifero e rimangono nell'intestino possono tornare a una forma simile alla "leptomonade", chiamata promastigote retroleptomonade. Queste forme sono noti produttori del gel secretivo promastigota (*Promastigote Secretory Gel*, PSG).

Inoltre, viene potenziata la dimensione della popolazione dei promastigoti aptomonadi che sono ancorati all'intestino medio anteriore. Queste fasi, insieme alla produzione del PSG, creano il fenomeno della "mosca bloccata" che non può effettuare nuovi pasti senza rigurgitare le forme infettanti, processo indispensabile per la trasmissione.

È noto che i promastigoti retroleptomonadi generano flebotomi infetti con un numero molto più elevato di promastigoti metaciclici e una maggiore capacità di trasmissione (Bates, 2018).

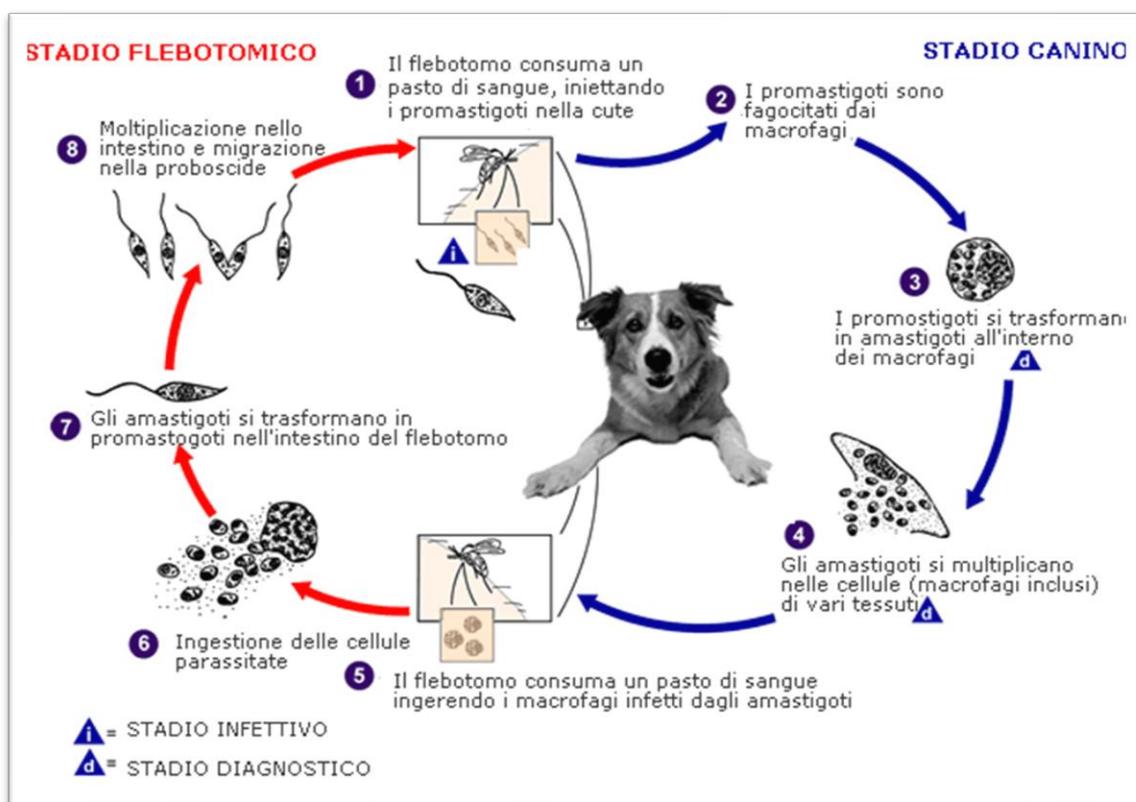


Figura 9: ciclo biologico di *L. infantum*.

2.5.5 PATOGENESI E IMMUNOLOGIA

Dopo l'inoculazione dei promastigoti nella cute, le cellule dendritiche del derma presentano l'antigene ai linfociti T. Migrano quindi al linfonodo più vicino per presentare gli antigeni ai linfociti T immaturi, stimolando la proliferazione dei linfociti T CD4+ e CD8+.

Da questo momento viene attivata la risposta immunitaria cellulo-mediata (Th1) o umorale (Th2), dalla quale dipenderà l'esito dell'infezione.

Dopo l'infezione iniziale, i promastigoti vengono fagocitati dai macrofagi e da altre cellule fagocitarie, cambiando la loro forma in amastigoti intracellulari (Handman & Bullen, 2002; Rittig & Bogdan, 2000). Gli amastigoti si moltiplicano all'interno della cellula fino a provocarne la lisi e vengono rilasciati nel torrente circolatorio o in altri distretti: milza, fegato, linfonodi, midollo osseo, rene, cute, ecc.

I neutrofili svolgono un ruolo importante nella risposta immunitaria all'infezione da *Leishmania* spp. Essi, infatti, sono i primi ad essere richiamati nel sito d'infezione e la loro interazione con il parassita, tramite fagocitosi, può portare alla distruzione di quest'ultimo e al reclutamento di macrofagi.

La fagocitosi del parassita da parte dei neutrofili innesca il rilascio di TNF- α e IFN- γ , meccanismo che serve al reclutamento dei macrofagi nei tessuti infetti e alla loro attivazione per l'uccisione del parassita (Carlsen et al., 2015; Wardini et al., 2019).

Il parassita può anche avere una crescita limitata all'interno delle cellule fagocitarie e l'infezione rimane così controllata (Kaye e Scott, 2011; Terrazas et al., 2015). I parassiti, per rimanere in vita più a lungo all'interno dei neutrofili, adottano un meccanismo simile al "cavallo di Troia", permanendo dentro il vacuolo parassitoforo. Nei modelli murini, si è visto che essi vengono fagocitati dai macrofagi senza alcuna risposta infiammatoria (Aga et al., 2002; De Menezes et al., 2016; Regli et al., 2017).

I macrofagi sono le principali cellule ospite per *Leishmania* spp. Al loro interno, l'enzima sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS) stimola la produzione di ossido nitrico, causando la morte del parassita e controllandone quindi la diffusione (Holzmuller et al., 2005). Dopo la fagocitosi, il parassita sopravvive all'interno del vacuolo parassitoforo e da qui manipola i sistemi di risposta dei macrofagi per evitare la distruzione.

L. infantum, producendo sostanze antiossidanti – tra cui la superossido dismutasi –, riduce gli effetti dell'ossido nitrico e promuove la crescita dei parassiti all'interno della cellula (Longoni et al., 2013).

Nel corso dell'infezione da *L. infantum*, i linfociti T – e in particolare le cellule T helper 1 (Th1 CD4+) – svolgono un ruolo fondamentale nella prevenzione della crescita dei parassiti e nello sviluppo della malattia (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Queste cellule, infatti, producono IFN- γ che, in combinazione con il CD40 esposto sulle cellule T CD4+, determina l'attivazione dei macrofagi. Inoltre, è stato dimostrato che le cellule Th1, nei sistemi sperimentali murini, producono TNF- α , IL-3 e CXCL2, importanti rispettivamente nella differenziazione, nel reclutamento e nel mantenimento dei macrofagi nel sito d'infezione.

Nel corso della malattia in forma subclinica le cellule T CD8+ con azione citotossiche aiutano a controllare l'infezione uccidendo i macrofagi infetti (Alexandre-Pires et al., 2010; Reis et al., 2006). Inoltre, per prevenire i danni che possono indurre le citochine proinfiammatorie, viene prodotta una piccola quantità di IL-10 (Carrillo & Moreno, 2009; Chamizo et al., 2005; Gibson-Corley et al., 2008). Con la progressione della malattia, il sistema immunitario inizia a perdere la capacità di mantenere questo delicato equilibrio con i meccanismi di protezione da danno infiammatorio (Boggiatto et al., 2011; Carrillo & Moreno, 2009).

Nella malattia in forma clinica si verifica un cambiamento nella risposta regolatoria, a causa dell'esposizione prolungata all'antigene.

Infatti, la produzione di IL-10 determina una diminuzione della proliferazione delle cellule T protettive Th1 CD4+ che riduce il numero di cellule T che producono IFN- γ , traducendosi in una mancanza di attivazione dei macrofagi e quindi in una riduzione dell'uccisione del parassita (Esch et al., 2013; Nylen et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2016).

Le cellule B svolgono un ruolo importante nella prevenzione della progressione della malattia.

I linfociti B sono deputati alla produzione di anticorpi contro la leishmania e attivano i linfociti T helper che inducono la produzione di IL-10.

Nella malattia subclinica le cellule B svolgono un ruolo nella risposta umorale del sistema immunitario, attivando le cellule T CD4+ e producendo anticorpi specifici. Nella forma clinica, man mano che il parassita continua a propagarsi, si verifica un aumento del livello di anticorpi non specifici IgG. Le IgG possono legarsi all'antigene, creando complessi che innescano la produzione di IL-10 da parte dei macrofagi (Gibson-Corley et al., 2010; Miles et al., 2005). La produzione di IL-10 da parte dei macrofagi agisce come *feedback* negativo, riducendo l'attivazione dei macrofagi e di conseguenza la produzione di ossido nitrico, fondamentale per l'uccisione dei parassiti. Inoltre, l'aumento della produzione di anticorpi determina anche la deposizione di immunocomplessi in vari distretti ed organi.

L'esito dell'infezione dipenderà dal tipo di risposta immunitaria innescata.

Alcuni dei soggetti colpiti dalla malattia sono in grado di controllare l'infezione, poiché in questi predomina una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediata. I linfociti Th1 CD4+ promuovono l'attivazione dei macrofagi, all'interno dei quali il parassita viene eliminato grazie alla produzione dell'ossido nitrico.

Nei soggetti clinicamente malati, invece, predomina una risposta di tipo umorale con riduzione della risposta cellulare, che sarà di tipo misto Th1/Th2. I linfociti Th2 riducono il rilascio di citochine "positive" da parte dei Th1 e sono responsabili della produzione di altre citochine – come IL-4 e IL-10 – che, insieme alla risposta

anticorpale, sembrano essere correlate negativamente alla progressione della malattia (Hosein et al., 2017; Koutinas & Koutinas, 2014; Solano-Gallego et al., 2009).

Diversi Autori (De Vasconcelos et al., 2019; Quinnell et al., 2009) hanno evidenziato che in alcune razze canine – in particolare, Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e Pastore Tedesco – la suscettibilità alla malattia sembra essere associata all'espressione del gene SLC11A1 (*Solute Carrier Family 11 Member 1*) e/o al polimorfismo del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II, mentre il Podenco Ibicenco pare sia la razza più resistente all'infezione (Solano-Gallego et al., 2000; De Vasconcelos et al., 2019).

Alla risposta immunitaria sono associate le diverse lesioni d'organo. Nella risposta umorale le lesioni cutanee sono generalmente rappresentate da lesioni nodulari, mentre in quella cellulo-mediata da dermatite.

L'organo più colpito durante la risposta umorale, a causa della deposizione di immunocomplessi, è il rene; le lesioni, caratterizzate da glomerulonefrite acuta ed extramembranosa, portano ad insufficienza renale.

Soggetti malati ma con risposta umorale scarsa o nulla non sviluppano lesioni renali (Nieto et al., 1992).

2.5.6 SEGNI CLINICI

Secondo molti studi, il periodo d'incubazione della leishmaniosi varia da 1-3 mesi ad alcuni anni.

La malattia nel cane è caratterizzata da marcato pleomorfismo del quadro clinico. La sintomatologia varia in funzione delle diverse risposte da parte dei singoli soggetti all'esposizione all'agente patogeno e alla risposta immunitaria che ne scaturisce.

<p>Segni clinici</p> <p>Sistemici</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumento di volume dei linfonodi esplorabili • Perdita di peso • Diminuzione o aumento dell'appetito • Letargia • Pallore delle mucose • Splenomegalia • Poliuria e polidipsia • Febbre • Vomito • Diarrea <p>Cutanei</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dermatite esfoliativa non pruriginosa con o senza alopecia • Dermatite erosivo-ulcerativa • Dermatite nodulare • Dermatite papulosa • Dermatite pustolosa • Onicogrifosi <p>Oculari</p> <ul style="list-style-type: none"> • Blefarite (esfoliativa, ulcerativa o nodulare) e congiuntivite (nodulare) • Cheratocongiuntivite (comune o secca) • Uveite anteriore • Endoftalmite <p>Altri</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lesioni mucocutanee e mucosali ulcerative o nodulari (orali, genitali e nasali) • Epistassi • Zoppia (poliartrite erosiva o non erosiva, osteomielite, polimiosite) • Miosite atrofica dei muscoli masticatori • Disordini vascolari (vasculite sistemica, tromboembolismo arterioso) • Disordini neurologici
--

Tabella 1: segni clinici della leishmaniosi canina (Castagnaro et al., 2007).

La leishmaniosi canina viene classificata in forma acuta, subacuta e cronica (Mancianti et al., 1988).

Le infezioni sperimentali hanno fornito informazioni su ciò che accade durante i vari stadi della malattia.

Nella fase iniziale, la sintomatologia è aspecifica: dimagrimento, astenia e apatia, vomito, diarrea, febbre, diminuzione o perdita dell'appetito sono i segni clinici maggiormente descritti.

Successivamente, a seconda dell'evoluzione del processo patologico, i cani sviluppano linfoadenopatia, con aumento delle dimensioni e della consistenza dei linfonodi esplorabili (poplitei, prescapolari e sottomascellari).

L'epatomegalia e la splenomegalia sono reperti patologici riscontrabili nella fase in cui è presente linfadenopatia.

Le lesioni cutanee che si riscontrano in corso di leishmaniosi sono molto diverse tra loro e hanno varie localizzazioni: piccole aree alopeciche, seborrea, dermatite esfoliativa, erosivo-ulcerativa, nodulare, papulosa e/o pustolosa. La sede di queste lesioni può localizzarsi a livello di tartufo, zona perioculare e orecchie, oppure può essere estesa in tutto il corpo.

Molto frequenti sono i segni clinici oculari, rappresentati da blefarite (esfoliativa, ulcerativa o nodulare), congiuntivite (nodulare), cheratocongiuntivite (comune o secca), uveite anteriore ed endoftalmite.

L'epistassi uni- o bilaterale è un segno comune in corso di leishmaniosi.

Anche la miosite atrofica (Vamvakidis et al., 2000) e l'onicogrifosi sono aspetti caratteristici della malattia.

In alcuni casi si riscontrano lesioni mucocutanee e mucosali ulcerative o nodulari (orali, genitali e nasali).

In molti casi si riscontrano zoppie causate da poliartrite erosive o non-erosiva, osteomielite e polimiosite.

Altri quadri riscontrati sono i disordini vascolari (vasculite sistemica, tromboembolismo arterioso) e quelli neurologici (Viñuelas et al., 20019).

Nelle forme più gravi o in quelle croniche si riscontra malattia renale, che può manifestarsi come lieve proteinuria, sindrome nefrosica o insufficienza renale cronica.

L'insufficienza renale è la causa principale che porta alla morte dell'animale. Si instaura in seguito alla deposizione di immunocomplessi a livello glomerulare, che induce infiammazione con conseguente glomerulosclerosi, ipertensione renale e nefrite tubulointerstiziale.

2.5.7 ALTERAZIONI EMATO-BIOCHIMICHE ED ESAMI DI LABORATORIO

Le alterazioni ematologiche nella leishmaniosi canina non sono specifiche (Kiral et al., 2004).

Spesso viene riscontrata neutrofilia, dovuta a una risposta infiammatoria sistemica o a lesioni cutanee ulcerative e infezione batterica secondaria (Kiral et al., 2004; Nicolato et al., 2013); sono descritte occasionalmente linfopenia, linfocitosi o eosinofilia (Nicolato et al., 2013; De Tommasi et al., 2014).

Il quadro ematologico più comune nel cane affetto da leishmaniosi è l'anemia, da lieve a moderata, normocitica normocromica; la patogenesi può essere la ridotta sintesi di eritropoietina a causa dell'insufficienza renale.

La trombocitopenia, da lieve a moderata, è molto frequente nei cani leishmaniotici; il meccanismo più probabile è quello di origine immuno-mediata (Cortese et al., 2011; Cortese et al., 2009; Terrazzano et al., 2006).

Occasionalmente vengono riscontrati fenomeni di coagulazione intravascolare disseminata (CID) (Honse et al., 2013).

Le alterazioni biochimiche comprendono alterazioni della funzionalità renale ed epatobiliare.

Nei casi di insufficienza renale, sono di frequente riscontro iperazotemia e ipercreatininemia. La misurazione dei livelli di creatinina, tuttavia, non viene considerata come *marker* sensibile per rilevare le prime fasi dell'insufficienza renale (Stockham et al., 2008).

Come biomarcatore precoce per la diagnosi di malattia renale cronica (CKD) si può usare la dimetilarginina simmetrica (SDMA) (Jepson et al., 2008; Nabity et al., 2015).

Attualmente, sono pochi gli studi sul potere diagnostico della SDMA nella CKD precoce in cani affetti da leishmaniosi. La misurazione diretta del tasso di filtrazione glomerulare (GFR) attraverso test di *clearance* sarebbe il metodo migliore per

valutare la funzionalità dei reni in tempo reale (Von Hendy-Willson & Pressler, 2011). Sono sempre più diffusi gli studi per identificare marcatori precoci per la riduzione della GFR, sia nei cani leishmaniotici che affetti da altri tipi di CKD.

L'attività degli enzimi epatici, quali aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT) e fosfatasi alcalina (ALP), in alcuni casi può anche risultare alterata (Paltrinieri et al., 2016).

L'ipergammaglobulinemia associata a ipoalbuminemia è comune. La diminuzione del rapporto albumina/globulina (A/G) è così frequente da essere considerata da alcuni autori uno dei test più sensibili per la leishmaniosi canina (Almeida et al., 2005).

Nella leishmaniosi, la gammopatia è tipicamente policlonale, sebbene possa essere anche oligoclonale biclonale o monoclonale (Font et al., 1994; Vailati et al., 2009).

Nei cani con nefropatia si riscontrano anomalie dell'analisi delle urine, quali diminuzione del peso specifico delle urine, glicosuria e proteinuria.

All'esame del sedimento urinario, è frequente la presenza di cilindri granulari o cellulari.

Esame emocromocitometrico

- Anemia arigenativa lieve o moderata
- Leucocitosi o leucopenia: (neutrofilia, neutropenia, linfopenia)
- Trombocitopenia

Profilo coagulativo

- Alterazioni dell'emostasi secondaria e fibrinolisi

Profilo biochimico

- Iperazotemia e ipercreatininemia
- Aumento degli enzimi epatici

Elettroforesi delle proteine sieriche

- Iperproteinemia
- Ipeglobulinemia (gammaglobulinemia, e/o betaglobulinemia policlonale)
- Ipoalbuminemia
- Riduzione del rapporto albumina/globuline

Esame delle urine

- Proteinuria

Tabella 2: alterazioni di laboratorio (Castagnaro et al., 2007).

2.5.8 DIAGNOSI

La diagnosi di leishmaniosi si basa sulla valutazione di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche compatibili con la malattia e sulla conferma dell'infezione da *L. infantum* attraverso l'impiego di metodiche diagnostiche parassitologiche, sierologiche e molecolari.

Metodiche parassitologiche: rappresentate dagli esami citologici e istologici, basati sulla messa in evidenza del parassita.

La citologia deve essere eseguita in tutti i casi quando si presentano lesioni cutanee papulari o nodulari e/o ingrossamento dei linfonodi (Paltrinieri et al., 2010).

Il riscontro di amastigoti in lesioni nodulari con localizzazione atipica – come la lingua (Parpaglia et al., 2007; Viegas et al., 2012), il testicolo (Diniz et al., 2005; Manna et al., 2012) e le masse orali o nasali (Levy et al., 2006) – è ampiamente descritto in letteratura, come anche l'isolamento dei parassiti nel liquido sinoviale (Sbrana et al., 2014; Santos et al., 2006) e in quello cerebrospinale (Marquez et al., 2013).

I tipici quadri citologici associati alla leishmaniosi sono generalmente caratterizzati da infiammazione granulocitico-macrofagica o piogranulomatosa associata a infiltrazione linfoplasmocitica, da moderata a grave. Quando si osservano *pattern* citologici coerenti con la leishmaniosi ma non si riscontrano amastigoti, la leishmaniosi non deve essere esclusa. In questi casi, bisogna approfondire le indagini diagnostiche con test che hanno una maggiore sensibilità analitica e diagnostica, come la *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

L'istologia può dimostrare la presenza di *Leishmania* sp. in sezioni di routine colorate con ematossilina-eosina. Anche se l'identificazione degli amastigoti può essere più difficile che nei campioni citologici, la presenza degli amastigoti può essere confermata con le tecniche di immunisto chimica. L'istologia ha il vantaggio di fornire ulteriori informazioni sul *pattern* citoarchitettone delle lesioni.

Metodiche sierologiche: rilevano gli anticorpi anti-leishmania presenti nel siero, plasma o sangue intero.

Questi esami si basano su tre principali test analitici: immunofluorescenza indiretta (IFAT), immunoassorbimento enzimatico (ELISA), immunocromatografia (ICT). Quest'ultimo metodo è alla base di tutti i test rapidi usati nella pratica clinica che forniscono solo un risultato qualitativo (cioè, presenza/assenza di anticorpi). In caso di risultato positivo, deve essere eseguita una sierologia quantitativa (ELISA o IFAT).

L'IFAT è considerato il metodo sierologico di riferimento raccomandato dall'Organizzazione Mondiale della Salute (OMS) (Gradoni & Gramicca 2000); ha elevata sensibilità e specificità.

L'ELISA è anch'esso un test molto sensibile e specifico ed è più facile da standardizzare, poiché i risultati vengono letti da uno spettrofotometro automatizzato; l'IFAT, invece, si basa su una valutazione operatore-dipendente.

L'uso crescente della vaccinazione contro la leishmaniosi può complicare l'interpretazione della sierologia, poiché non sono sempre disponibili metodiche di laboratorio che consentano la discriminazione tra la risposta immunitaria vaccinale e quella che scaturisce dall'infezione naturale.

Metodiche molecolari: PCR e PCR *real-time*, basate sull'identificazione del DNA del parassita. Sono ampiamente utilizzate nella pratica di routine e vengono eseguite su substrati quali midollo osseo, linfonodi, milza, lesioni cutanee, sangue intero o *buffy coat*. Recenti studi hanno dimostrato che i tamponi congiuntivali e, in misura minore, orale e nasale sono molto sensibili per la ricerca della leishmania. Questi metodi offrono due vantaggi principali: sono poco soggetti a contaminazione e forniscono informazioni sul numero di copie del DNA presente nel campione. Quest'ultimo aspetto può essere rilevante durante il *follow-up*, per monitorare l'efficacia dei trattamenti leishmanicidi. In tal caso, è consigliabile utilizzare la PCR

quantitativa al momento della diagnosi (prima di qualsiasi trattamento), per stabilire un valore di riferimento per il confronto dei risultati futuri durante il monitoraggio della terapia. Quando si interpretano i risultati della PCR, è necessario tenere presente la differenza tra cani infetti e cani malati. Il rilevamento del DNA del parassita indica che il cane è infetto. La correlazione tra infezione e malattia deve poi basarsi sulla presenza di anomalie cliniche e di laboratorio (Paltrinieri et al., 2016).

2.5.9 STADIAZIONE CLINICA

La stadiazione clinica della leishmaniosi riveste un ruolo di fondamentale importanza per vari aspetti: clinici, terapeutici ed epidemiologici.

Le raccomandazioni del Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina (Canine Leishmaniasis Working Group, CLWG), relative alla stadiazione della leishmaniosi canina, sono riassunte nella tabella 3 (Oliva et al., 2008; Paltrinieri et al., 2010).

Questa classificazione si basa sulla definizione dei soggetti in base alla loro esposizione all'agente patogeno e alla loro risposta immunitaria. Gli stadi sono numerati con le lettere dalla A alla E, in ordine crescente di gravità di esposizione alla malattia.

Stadio A: cane esposto

Vengono definiti “esposti” i cani clinicamente sani nei quali i test diagnostici citologici, parassitologici e molecolari risultano negativi ma con titoli anticorpali specifici, non superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento. Secondo il Centro di Referenza Nazionale per le Leishmaniosi (CReNaL) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) della Sicilia, “A Mirri”, il *cut-off* è rappresentato dal titolo 1:80.

Stadio B: cane infetto

Un cane infetto è un soggetto nel quale è dimostrabile la presenza del parassita, con metodi diretti (microscopia, coltura o PCR) e con metodi indiretti (messa in evidenza di anticorpi specifici).

Stadio C: cane malato

Un cane infetto con alterazioni clinico-patologiche ascrivibili a *Leishmania* sp. e nel quale sia dimostrabile il parassita con metodi diagnostici diretti o con titoli anticorpali superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento è definito malato.

Stadio: cane malato con quadro clinico grave

Cane malato con gravi alterazioni clinico-patologiche.

Stadio E: cane malato refrattario o recidivo

Cani che si dimostrano refrattari alla terapia o cani sottoposti a terapia ma che mostrano recidiva precoce.

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. 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.

Tabella 3: stadiazione della LCan secondo il CLWG (Paltrinieri et al., 2010).

Il sistema di stadiazione del gruppo Leishvet (Oliva et al., 2008), invece, definisce cinque stadi in base alla gravità della malattia e dei segni clinici. Nel momento in cui la diagnosi di leishmaniosi è accompagnata da un'alterata funzionalità renale, a partire dallo stadio III, vi è un'ulteriore suddivisione in due sottostadi (a e b).

<p>STADIO I: Malattie lievi, soggetto sieronegativo o con titolo anticorpale basso. Cani con segni clinici lievi, come aumento di volume di un singolo linfonodo o dermatite; non si osservano alterazioni clinico-patologiche. Profilo renale normale: creatinina <1,4 mg/dL; non proteinurico: UPC <0,2</p>
<p>STADIO II: Malattia moderata; titolo anticorpale da basso a elevato. Cani che, oltre ai segni clinici elencati per lo Stadio I, possono presentare: lesioni cutanee simmetriche o diffuse, come dermatite esfoliativa/onicogrifosi, ulcere (tartufo, cuscinetti plantari, prominenze ossee, giunzioni muco-cutanee); linfoadenomegalia generalizzata; perdita di appetito; perdita di peso; alterazioni clinico-patologiche, come lieve anemia non rigenerativa, iper-gammaglobulinemia, ipoalbuminemia, sindrome da iperviscosità sierica.</p> <p>Sottostadio</p> <p>a) profilo renale normale: creatinina <1,4 mg/dL; non proteinurico: UPC <0,5</p> <p>b) creatinina <1,4 mg/dL; UPC= 0,5-1</p>
<p>STADIO III: Malattia grave; titoli anticorpali da medi ad elevati. Cani che, oltre ai segni clinici elencati negli Stadi I e II, possono presentare:</p> <ul style="list-style-type: none"> - segni causati da lesioni da immuno-complessi (e.g. uveite e glomerulonefrite); alterazioni clinico-patologiche elencate nello Stadio II; - insufficienza renale cronica (IRC) in stadio IRIS I con UPC= 1-5 o stadio II (creatinina 1,4-2 mg/dL)
<p>STADIO IV: Malattia molto grave; titoli anticorpali da medi a elevati. Cani con segni clinici elencati nello Stadio III. Tromboembolismo polmonare o sindrome nefrosica e malattia renale allo stadio finale. Alterazioni clinico-patologiche elencate nello Stadio II, stadio IRIS III (creatinina 2,1-5 mg/dL) e stadio IV (creatinina >5 mg/dL) o sindrome nefrosica: marcata proteinuria UPC >5</p>

Tabella 4: stadiazione della LCan secondo il Gruppo di studio Leishvet (Oliva et al., 2008).

La funzionalità renale viene valutata secondo le linee guida IRIS (International Renal Interest Society), sistema di stadiazione della CKD.

Questo approccio si basa su un'approfondita valutazione clinica, che comprende la misurazione della pressione arteriosa, e sulla quantificazione delle proteine urinarie e dei *marker* di funzionalità renale.

STADIO	CREATININA SIERICA (mg/dl)	SDMA (µg/dL)	ALTERAZIONI
1	<1,4	<18	Non azotemico
2	1,4-2,8	18-35	Lieve azotemia renale, segni clinici lievi o assenti
3	2,9-5,0	36-54	Moderata azotemia renale, possibili segni clinici sistemici
4	>5	>54	Segni clinici sistemici, crisi uremica

Tabella 5: stadiazione della malattia reanale secondo le linee guida IRIS (www.iris-kidney.com. International Renal Interest Society; 2019).

Nella sottoclassificazione in base alla proteinuria deve essere valutato il rapporto PU/CU in pazienti che non presentino infiammazioni del tratto urinario, emorragie o disproteinemie; un rapporto PU/CU < 0,2 definisce il paziente non proteinurico, da 0,2 a 0,5 proteinurico *borderline* mentre > 0,5 proteinurico.

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

Nella sottoclassificazione in base alla pressione arteriosa (PA) pazienti con pressione sistolica <10 mm Hg al di sopra dell'intervallo di riferimento specifico della razza sono considerati a rischio minimo, quelli con una pressione sistolica 10-20 mm Hg sopra il range di riferimento specifico per razza sono a basso rischio, una pressione sistolica 20-40 mm Hg sopra il range specifico per razza indica un rischio moderato e pazienti con una pressione sistolica >40 mm Hg al di sopra dell'intervallo di riferimento specifico della razza hanno un alto rischio di danno renale. In particolare, pazienti con valori da 160 a 179 mm Hg misurata in una o due settimane sono definiti ipertesi e quelli con pressione sanguigna sistolica ≥180 mm Hg sono gravemente ipertesi.

2.5.10 TERAPIA

La scelta terapeutica viene effettuata basandosi sulla stadiazione del paziente in base alle linee guida Leishvet precedentemente descritte (Solano-Gallego et al., 2011).

I farmaci di prima scelta per il trattamento della leishmaniosi sono l'allopurinolo in associazione o meno ad antimonato di N-metilglucamina o a miltefosina.

Allopurinolo: è un farmaco leishmaniostatico e viene utilizzato per il trattamento a lungo termine in monoterapia o in associazione all'antimoniato di N-metilglucamina o alla miltefosina.

L'allopurinolo è un composto analogo dell'ipoxantina, che interferisce con la sintesi dell'acido urico. Infatti, le leishmanie sono incapaci di sintetizzare le purine e devono dunque utilizzare le basi azotate dell'ospite; l'allopurinolo una volta incorporato dal parassita, dà luogo a composti tossici che ne causano la morte.

Il dosaggio a cui viene somministrato comunemente l'allopurinolo è di 10 mg/Kg, ogni 12 ore, per bocca.

L'effetto collaterale principale della terapia con allopurinolo è lo sviluppo di urolitiasi da xantina nei cani trattati a lungo termine (Torres et al., 2016).

Inoltre, uno studio del 2016 ha individuato dei ceppi di *L. infantum* resistenti all'azione dell'allopurinolo (Yasur-Landau et al., 2016).

Altri studi sono in corso per valutare la possibilità di nuovi composti terapeutici che abbiano la stessa azione dell'allopurinolo, come ad esempio nucleotidi liberi e composti esosi-correlati attivi (Segarra et al., 2017).

Antimonato di N-metilglucamina: è un farmaco leishmanicida usato in associazione con l'allopurinolo al dosaggio di 100 mg/Kg, per via sottocutanea, una volta al giorno o suddividendo la dose in due somministrazioni giornaliere (BID), per 4-6 settimane; una riduzione del dosaggio per i primi 2-3 giorni può essere utile per valutare eventuali effetti avversi (Solano-Gallego et al., 2011).

Gli effetti collaterali più frequentemente descritti sono: istolesività nel punto di inoculo, diarrea e febbre.

L'antimonato di N-metilglucammina è potenzialmente nefrotossico, sebbene recenti studi abbiano messo in dubbio il suo ruolo nel peggioramento del quadro renale, poiché non è dimostrabile che esso sia dovuto alla somministrazione del farmaco o al progredire della malattia.

L'eliminazione del farmaco avviene quasi tutta ad opera del rene.

Miltefosina: è una molecola leishmanicida, analoga dei fosfolipidi, anche se il suo meccanismo d'azione non è stato del tutto chiarito (Dorlo et al., 2012); si presuppone che interferisca con l'omeostasi del calcio del parassita (Pinto-Martinez et al., 2018).

Viene usata in associazione con allopurinolo, al dosaggio di 2 mg/Kg una volta al giorno, somministrata per via orale, per un periodo di 28 giorni.

Gli effetti avversi che derivano dalla somministrazione di miltefosina sono esclusivamente a carico dell'apparato gastroenterico: vomito e diarrea.

La metabolizzazione del farmaco avviene per via epatica e l'eliminazione per via renale.

Diversi studi hanno confrontato l'efficacia delle due molecole leishmanicide e non sono state riscontrate differenze significative (Manna et al., 2015). Viceversa, in caso di monoterapia, molti studi hanno confermato l'inefficacia o la comparsa di recidive precoci per entrambe le molecole; pertanto, è sempre raccomandata l'associazione con l'allopurinolo.

Domperidone: è stato approvato come farmaco preventivo e terapeutico quando associato ad allopurinolo e antimonato di N-metilglucammina o miltefosina. Questo farmaco ha proprietà immunomodulatorie e rafforza la risposta immunitaria Th1 (Walker et al., 1995).

Nelle aree endemiche, si raccomanda come trattamento preventivo la somministrazione di domperidone per 30 giorni al dosaggio di 0,5 mg/Kg, ogni 4

mesi dall'inizio alla fine della stagione dei flebotomi, poiché ciò riduce il rischio di sieroconversione nei cani sani (Sabaté et al., 2014). Può essere utilizzato anche per i cani che viaggiano in aree endemiche, iniziando la terapia almeno 5 giorni prima della partenza.

2.5.11 PROGNOSI E MONITORAGGIO

Dopo la diagnosi, il paziente deve essere periodicamente rivalutato e riclassificato, in base alla progressione o regressione della malattia (Solano-Gallego et al., 2009; Oliva et al., 2010; Paltrinieri et al., 2010).

La prognosi è favorevole nei cani classificati come cani esposti. Circa il 25% di questi può sviluppare una siero-reversione spontanea entro pochi mesi, anche senza ricorrere a terapia (Acedo-Sánchez et al., 1998; Otranto et al., 2009). Allo stesso modo, i cani infetti possono avere una prognosi favorevole se l'infezione non evolve in malattia conclamata (Castagnaro et al., 2007; Oliva et al., 2008, 2010; Paltrinieri et al., 2010).

In questi soggetti, tuttavia, se non viene intrapresa una terapia, può svilupparsi la malattia in forma clinica entro 2-3 anni dalla diagnosi (Manna et al., 2006; Oliva et al., 2006; Otranto et al., 2009; Paradies et al., 2010).

Per i soggetti inclusi negli stadi C, D ed E, la prognosi dipende dalla gravità di eventuali anomalie clinico-patologiche riscontrate al momento della diagnosi, dalla risposta individuale alla terapia e, in particolare, dal grado di compromissione della funzionalità renale (Noli & Auxilia, 2005).

La prognosi per i soggetti che presentano un danno renale grave, classificati nello stadio IRIS 3-4, è riservata o infausta. In questi soggetti, quando viene effettuato un trattamento appropriato, l'aspettativa di vita è maggiore, così come la qualità della vita stessa.

L'insufficienza renale cronica è la principale causa di morte, o motivo di eutanasia, nei cani con leishmaniosi (Mancianti et al., 1988; Planellas et al., 2009).

Il monitoraggio comporta la valutazione della risposta al trattamento degli animali negli stadi C, D ed E.

Nei soggetti classificati nello stadio A, il titolo anticorpale specifico dovrebbe essere valutato 2-4 mesi dopo la rilevazione iniziale della sieropositività. I cani infetti (stadio B) dovrebbero essere monitorati clinicamente e sierologicamente ogni 2-4 mesi per almeno 1 anno e successivamente ogni 6-12 mesi per il resto della loro vita.

Dal punto di vista clinico, l'obiettivo del monitoraggio durante il trattamento è stabilire se i segni clinici diminuiscono e quando i parametri ematologici e biochimici rientrano nei limiti della norma.

Durante il "*follow-up*", è fortemente consigliato eseguire sempre esami di laboratorio, quali: profilo emato-biochimico, esame delle urine, valutazione del PU/CU ed elettroforesi delle proteine sieriche. La sierologia dovrebbe essere ripetuta in genere 4-6 mesi dopo l'inizio del trattamento (Solano-Gallego et al., 2009; Oliva et al., 2010; Miró et al., 2011).

Dal punto di vista parassitologico, il monitoraggio è utile per valutare il potenziale infettivo dei soggetti sottoposti a trattamento.

2.5.12 PREVENZIONE

Il controllo dell'infezione si basa su quelle misure che impediscono la proliferazione dei vettori e delle loro attività ematofaghe (Otranto & Dantas-Torres 2013). L'uso regolare di insetticidi topici repellenti è altamente efficace nel prevenire le punture dei flebotomi (Miró et al., 2017, Galvez et al., 2018).

I membri del CVBD (*Companion Vector-Borne Diseases*) World Forum, per ridurre il rischio d'infezione da *L. infantum* nei cani e negli esseri umani, raccomandano di: promuovere la prevenzione contro la puntura del flebotomo; migliorare lo stato di

salute generale e nutrizionale dei cani; mettere in atto le più recenti linee guida in termini di gestione clinica, diagnosi e trattamento della leishmaniosi canina (Reguera et al., 2016).

La maggior parte delle formulazioni insetticide sono a base di piretroidi semisintetici (permetrina, deltametrina), usati da soli o in combinazione con altri insetticidi che ne potenziano l'efficacia. Le formulazioni dei repellenti presenti in commercio sono di due tipi: collari e *spot-on*.

Il trattamento con formulazioni *spot-on* a base di permetrina fornisce un'azione repellente (*anti-feeding*) nei confronti dei flebotomi per un periodo di 3-4 settimane. Nel caso di cani che viaggiano in zone endemiche, il prodotto dovrebbe essere applicato almeno due giorni prima della partenza (www.leishvet.org).

La formulazione *spot-on* di permetrina in combinazione con imidacloprid si è dimostrata essere una delle formule più efficaci disponibili in commercio.

I collari a base di deltametrina prevengono la puntura dei flebotomi. Diversi studi di campo hanno dimostrato l'efficacia di questo collare nella prevenzione dell'infezione da *Leishmania* sp. La sua durata di azione è di 5-6 mesi.

Un collare a base di flumetrina ha mostrato, in studi clinici di campo, una riduzione del rischio d'infezione da *L. infantum* fino ad 8 mesi (Brianti et al., 2014). I collari andrebbero applicati almeno 1-2 settimane prima del viaggio in zone endemiche.

I collari, oltre ad offrire un'elevata protezione, riducono il rischio di una seconda esposizione al parassita.

Le formulazioni topiche hanno effetto per 2-4 settimane ma il picco d'azione si ha a partire dalle 24 ore dopo la somministrazione, a differenza dei collari il cui massimo effetto si ha dopo due settimane dall'applicazione (Maroli et al., 2010).

Il vantaggio di queste formulazioni è di avere bassa tossicità per l'animale ed effetti collaterali scarsi o nulli.

Per ottenere il massimo dell'efficacia, i piretroidi dovrebbero essere applicati non solo sugli animali ma anche negli ambienti in cui prosperano i flebotomi (Picado et al., 2010; Das et al., 2012).

Il controllo vettoriale integrato, che prevede una combinazione di diversi approcci – come la protezione mediante barriera fisica, barriere meccaniche o l'uso trappole a base di feromoni specifici e di esche –, potrebbe essere un modo efficace per tenere sotto controllo i flebotomi nelle aree iperendemiche (Alexander & Maroli, 2003).

Basandosi sulla valutazione del rapporto rischio-beneficio, l'approccio multimodale che associa l'uso di repellenti e la vaccinazione dovrebbe essere considerato il metodo di prevenzione ottimale, sia per l'infezione che per lo sviluppo della malattia clinica.

Alcuni studi sperimentali suggeriscono che il trattamento terapeutico in cani risultati sieropositivi a *L. infantum* riduca l'infettività dei soggetti trattati, portando a una diminuzione dei flebotomi infetti (Miró et al., 2017; Gradoni et al., 1987; Segarra et al., 2018).

2.5.13 VACCINI

Sono attualmente disponibili in commercio quattro vaccini contro la leishmaniosi canina: Leishmune[®] (Zoetis, Brasile) e Leish-Tec[®] (Ceva Animal Health, Brasile), commercializzati solo in Brasile; CaniLeish[®] (Virbac Santé Animale, Francia) e Letifend[®] (Laboratorios Leti, Spagna), commercializzati in Europa (Solano-Gallego et al., 2017).

Le case farmaceutiche produttrici raccomandano la vaccinazione solo nei cani sani sieronegativi di almeno sei mesi di età. I vaccini non prevengono l'infezione ma la progressione della malattia, riducendo la probabilità di sviluppare segni clinici.

Studi recenti hanno dimostrato la validità della vaccinazione nel ridurre la progressione della malattia in cani con infezione subclinica (Toepp et al., 2019a;

Toepp et al., 2019b). L'effetto della vaccinazione è quello di far sviluppare all'organismo ospite una risposta immunitaria di tipo cellulare Th1, con produzione di IL-12 e IFN- γ .

Il vaccino CaniLeish[®] è basato su antigeni secreti/escreti di *L. infantum* ed è registrato in Europa dal 2011. Questo vaccino contiene la saponina come adiuvante. Lo schema vaccinale raccomandato consiste in tre inoculazioni ogni tre settimane e prevede un richiamo annuale. La protezione si ottiene un mese dopo la terza inoculazione.

Secondo uno studio del 2018, il vaccino CaniLeish[®] è in grado di indurre una risposta cellulo-mediata matura contro la leishmaniosi canina in tutti i cani vaccinati (Christelle Fontaine, et al., 2018).

Il vaccino Letifend[®], registrato in Europa dal 2016, contiene come sostanza attiva la “proteina Q”, una proteina ricombinante formata da cinque differenti antigeni di *L. infantum*. Secondo l'European Public Assessment Report (EPAR), questo vaccino non contiene adiuvante. Il piano vaccinale prevede una singola inoculazione con richiamo annuale.

È stato dimostrato che la somministrazione del vaccino LetiFend[®] è in grado di ridurre il numero di immunocomplessi circolanti (CIC) (Cacheiro-Llaguno et al., 2019). Un aspetto altamente vantaggioso del vaccino LetiFend[®] è quello di non interferire a livello diagnostico con i casi d'infezione naturale (Wylie et al., 2014).

Poiché i cani domestici costituiscono il principale serbatoio di *L. infantum*, questi animali svolgono un ruolo chiave nella trasmissione all'uomo. Lo strumento principale per controllare la diffusione dell'infezione e l'incidenza della leishmaniosi viscerale umana (VL) è l'immunizzazione dei cani con un vaccino sicuro ed efficace.

Capitolo 3

PARTE SPERIMENTALE

Sulla base dell'impatto della leishmaniosi nell'ambito della clinica degli animali d'affezione e i non trascurabili risvolti di sanità pubblica, si è ritenuto interessante valutare l'applicabilità della spettroscopia Raman nella diagnosi della leishmaniosi canina, che ancora oggi è un vero e proprio rebus, solo parzialmente risolto.

3.1 MATERIALE E METODI

ANIMALI: per lo studio, sono stati arruolati n. 33 cani, visitati presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) dell'Università degli Studi di Messina o presso i canili sanitari/rifugi di Petralia Sottana (PA) e Millemusi di Messina, durante il periodo gennaio 2019 – settembre 2021.

Gli animali erano n. 14 cani sani di controllo e n. 19 cani con diagnosi di leishmaniosi come unica malattia/infezione. In tutti gli animali venivano effettuate le seguenti valutazioni: esame clinico completo, compreso il punteggio della condizione corporea (*Body Condition Score*, BCS); test sierologico (IFAT) per leishmaniosi; test rapido ELISA per le principali malattie da vettore (SNAP 4Dx Plus, Idexx). Il test indaga per la presenza di anticorpi verso i seguenti agenti patogeni: *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Dirofilaria immitis*. Contestualmente, veniva effettuato un esame ematologico su goccia spessa e su striscio di *buffy coat*, rispettivamente per la ricerca diretta di eventuali piroplasmi o microfilarie.

Criteri di inclusione: gli animali selezionati per accedere allo studio dovevano essere positivi all'IFAT e/o agli esami parassitologici diretti per leishmaniosi e non trattati al momento dell'arruolamento. Per la costituzione del gruppo controllo, gli animali dovevano essere clinicamente sani, senza alterazioni del profilo ematologico

ed ematochimico di base e negativi all'IFAT per leishmaniosi e ai test per malattie da vettore.

Criteri di esclusione: non erano inclusi dalla ricerca tutti gli animali già in terapia per leishmaniosi, quelli positivi agli esami sierologici o diretti per altre patologie da vettore o che risultavano affetti da patologie differenti dalla leishmaniosi.

La ricerca si è svolta in tre fasi:

- **Fase 1:** in questa fase preliminare, sono stati confrontati gli spettri Raman di sieri di cani sicuramente affetti da leishmaniosi con quelli di cani sani, al fine di ricercare differenze che potessero essere ricondotte alla malattia;
- **Fase 2:** sono stati analizzati con spettroscopia Raman sieri di cani sani e di cani sieropositivi alla leishmaniosi, al fine di verificare la specificità diagnostica della metodica;
- **Fase 3:** sono stati analizzati con spettroscopia Raman sieri di cani affetti da leishmaniosi durante il trattamento terapeutico, al fine di evidenziare modificazioni dello spettro attribuibili alla terapia e utilizzabili a scopo prognostico.

Durante tutte le fasi l'analista non conosceva preliminarmente lo stato sanitario degli animali.

Fase 1 – Durante il periodo gennaio 2019 – gennaio 2020, sono stati arruolati n. 10 cani diversi per razza (n. 4 Meticci; n. 2 Carlini; n. 2 Labrador Retriever; n. 1 Jack Russel; n. 1 Pastore Tedesco), sesso (n. 5 femmine, di cui una sterilizzata; n. 5 maschi, di cui uno castrato) ed età (1-7 anni) (Tabella 1), visitati presso l'OVUD di Messina (n. 5 cani) o il canile/rifugio di Messina (n. 5 cani).

Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi, in relazione allo stato di salute: cani affetti da leishmaniosi (*gruppo Leishmania*) e cani sani (*gruppo Controllo*).

La diagnosi di leishmaniosi veniva stabilita secondo le linee guida descritte dal "Canine Leishmaniasis Working Group", CLWG (Oliva et al., 2008; Paltrinieri et

al., 2010). Gli animali arruolati erano classificati come appartenenti allo stadio C “Malato”, cioè cani infetti nei quali sia dimostrabile il parassita o titoli anticorpali (IFAT) superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento dell’area geografica, nella fattispecie il Centro di Referenza Nazionale per le Leishmaniosi (CReNaL), dell’Istituto Zooprofilattico (IZS) della Sicilia, “A. Mirri” (*cut-off*: 1:80). Tutti i cani presentavano diversi segni clinici ascrivibili a leishmaniosi.

Gli animali del gruppo controllo erano animali sani, portati a visita per profilassi vaccinale e sottoposti a periodico controllo sierologico per leishmaniosi.

N°	Gruppo	Nome	Razza	Sesso	Età	Titolo IFAT
1	Controllo	Carlotta	Carlino	FS	5 anni	Neg
2		Teodoro	Carlino	MC	3 anni	Neg
3		Gigi	Labrador R.	M	4 anni	Neg
4		Maya	Jack Russel T,	F	5 anni	Neg
5		Dox	Labrador R.	M	2 anni	Neg
6	Leishmania	Testa	Pit Bull	M	3 anni	1:320
7		Unghia	Meticcio	F	7 anni	1:1.280
8		Otto	Meticcio	M	<1 anno	1:10.240
9		Moka	Meticcio	F	6 anni	1:1.280
10		Marina	Pastore Tedesco	F	6 anni	1:1.280

Tabella 1: segnalamento degli animali arruolati nella *Fase 1* dello studio e titolo anticorpale anti-*Leishmania infantum* (immunofluorescenza indiretta, IFAT).

Fase 2 – In questa fase (febbraio 2020 – luglio 2020), sono stati raccolti n. 23 sieri di cani visitati presso l’OVUD di Messina (n. 12 cani) od ospitati presso il canile/rifugio di Palermo (n. 3 cani) o di Messina (n. 8 cani).

I cani sono stati suddivisi in tre gruppi, in base all’esito dell’IFAT per leishmaniosi e all’esame clinico:

- CG, comprendente n. 9 cani sieronegativi asintomatici;
- AG, comprendente n. 2 sieropositivi asintomatici, con titoli 1:160 e 1:320;
- LG, comprendente n. 12 sieropositivi sintomatici, con titoli variabili da 1:320 a 1:5.120 (Tabella 2).

N°	Nome	Razza	Sesso	Età (anni)	Titolo IFAT	Quadro clinico
11	Tremolina	Meticcio	F	2	Neg	Asintomatico
12	Pupa	Meticcio	F	6	Neg	Asintomatico
13	Achille	Meticcio	M	6	Neg	Asintomatico
14	Birilla	Rottweiler	F	4	Neg	Asintomatico
15	Azzolino	Meticcio	M	7	Neg	Asintomatico
16	Ade	Meticcio	M	1	Neg	Asintomatico
17	Emma	Labrador r.	F	2	Neg	Asintomatico
18	Riggia	Labrador r.	F	2	Neg	Asintomatico
19	Beagle	Beagle	M	1	Neg	Asintomatico
20	Ula	Meticcio	M	5	1:160	Asintomatico
21	Rex	P. Tedesco	M	5	1:320	Asintomatico
22	Mafalda	Meticcio	F	5	1:1280	Onicogrifosi; linfadenomegalia; dimagrimento; dermatite esfoliativa non pruriginosa senza alopecia; cheratocongiuntivite secca; vasculite dei margini auricolari
23	Dogo	Dogo Argentino	M	9	1:1280	Linfadenomegalia; dimagrimento; dermatite esfoliativa non pruriginosa senza alopecia
24	Ricky	Meticcio	M	5	1:320	IRC; dimagrimento
25	Molla	Meticcio	F	5	1:640	Linfadenomegalia; dermatite esfoliativa non pruriginosa con alopecia
26	Bosco	Rottweiler	M	3	1:5120	Linfadenomegalia; dermatite esfoliativa non pruriginosa senza alopecia; poliartrite
27	Balù	A. Malamute	M	3	1:320	Linfadenomegalia
28	Sole	Meticcio	M	4	1:2560	Linfadenomegalia; epistassi bilaterale; dermatite esfoliativa non pruriginosa senza alopecia
29	Spina	Meticcio	M	4	1:1280	Linfadenomegalia
30	Ophelia	Meticcio	F	5	1:1280	Dermatite esfoliativa non pruriginosa con alopecia Linfadenomegalia
31	Mushu	Rottweiler	M	2	1:1280	Onicogrifosi; linfadenomegalia; cheratocongiuntivite secca; dermatite esfoliativa non pruriginosa con alopecia
32	Achille	Pittbull	M	15	1:1280	Dimagrimento; linfadenomegalia; anemia
33	Argo	Beagle	M	8	1:1280	Dimagrimento; linfadenomegalia; anemia; epistassi

Tabella 2: segnalamento degli animali arruolati nella Fase 2 dello studio e relativi titoli IFAT e quadri clinici.

Fase 3 – In questa fase (ottobre 2020 – settembre 2021) sono stati raccolti i sieri di n. 5 cani affetti da leishmaniosi, già arruolati durante la *Fase 2* (cani n. 22, 27, 30, 31 e 33), in cui è stato possibile seguire il trattamento terapeutico in almeno uno dei due controlli previsti. I sieri sono stati raccolti nei seguenti punti tempo:

- **T0**: basale, al momento della diagnosi e prima del trattamento;
- **T1**: dopo due settimane di terapia;
- **T2**: a fine terapia.

Tutti gli animali sono stati trattati con sali di antimonio (Glucantime, 100 mg/Kg/die SC per 8 settimane) e allopurinolo (Sandoz, 15-20 mg/Kg ogni 12 ore).

Gli animali erano n. 4 cani di proprietà, visitati presso l'OVUD, e un cane ospitato presso il canile/rifugio di Messina. Per n. 2 animali (cani n. 30, 31) sono stati raccolti campioni di siero nei tre punti tempo previsti; in n. 2 animali (cani n.22, 27) non è stato possibile effettuare il controllo intermedio, per indisponibilità del proprietario; il restante animale (cane n. 33), invece, è deceduto dopo il primo controllo (T1).

Sugli animali, inoltre, venivano effettuate, quando possibile, le seguenti valutazioni:

- esame emocromocitometrico;
- profilo biochimico di base;
- protidogramma sierico;
- esame delle urine;
- esame molecolare (PCRq) su campione di linfonodo, ottenuto mediante agoinfissione.

CAMPIONI

Per tutti i soggetti, un'aliquota di siero veniva congelata a -20 °C per effettuare l'analisi spettroscopica Raman. I sieri venivano conservati congelati fino al momento dell'analisi, effettuata presso il laboratorio del Dipartimento di Scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali dell'Università degli Studi di Messina.

ESAME SPETTROSCOPICO RAMAN

Per l'analisi, i sieri sono stati analizzati tal quali. Ciascun campione è stato tenuto a temperatura ambiente per 45 minuti, prima di essere analizzato.

L'analisi spettroscopica Raman è stata effettuata mediante l'utilizzo di un DXR-SmartRaman Spectrometer (Thermo Fisher Scientific), il quale è dotato di un laser a diodi che utilizza una lunghezza d'onda di 785 nm per eccitare i campioni (Figura 1).



Figura 1: spettrometro Raman utilizzato per l'esecuzione delle misure.

Gli spettri Raman sono stati acquisiti nel *range* di lunghezze d'onda $400\text{-}3.300\text{ cm}^{-1}$, con una risoluzione di $1,9285\text{ cm}^{-1}$ e sono stati irraggiati con una Potenza laser di 24 mW, utilizzando uno spot di $50\text{ }\mu\text{m}$ spot.

Per l'esecuzione delle misure le *vials* contenenti il siero sono state posizionate all'interno del modulo 180 Degree Sampling Accessory. Al fine di ottenere degli spettri con un elevato rapporto segnale/rumore (S/N), ogni spettro Raman è stato

ottenuto come media di 32 esposizioni, con durata di ciascuna esposizione pari a 30 secondi, quindi il campionamento totale, per ottenere ciascun spettro, è stato pari a 16 minuti. Tutti gli spettri Raman sono stati memorizzati in due formati, un file SPA per il successivo *post-processing* utilizzando il *software* proprio dello spettrometro Raman (Omic Software) e un file CSV per il susseguente *post-processing* utilizzando *software* commerciali.

Analisi statistica

Gli spettri dei campioni considerati sono stati analizzati in *post-processing* mediante l'utilizzo del *software* Origin 7.0. Su ciascun spettro è stato sottratto il fondo e gli spettri sono stati raccolti per gruppo sperimentale. Per ciascun gruppo si è ottenuto lo spettro medio, il quale è stato normalizzato al picco della fenilalanina.

Per ogni spettro acquisito sono state eseguite la correzione della linea di base e la normalizzazione all'area integrata totale. L'area complessiva degli intervalli spettrali utilizzati per la diagnosi è stata ottenuta utilizzando la funzione "integrata" disponibile sul software Origin. Le bande spettrali sono state analizzate mediante una procedura di adattamento della curva per valutare l'area complessiva di ciascuna banda e di seguito sono state indicate utilizzando i loro centri di frequenza, calcolando poi il loro rapporto A1/A2.

Per confermare la presenza o l'assenza di malattia, è stato scelto un punto di *cut-off*. La curva della caratteristica di funzionamento del ricevitore (*Receiver Operating Characteristic*, ROC) è stata utilizzata per valutare la capacità di un biomarcatore di classificare lo stato della malattia. La curva ROC rappresenta il grafico della sensibilità vs specificità (Orkoula & Kontoyannis, 2014).

In questo studio, la sensibilità è riferita alla capacità della spettroscopia Raman di identificare correttamente i soggetti affetti da leishmaniosi; la specificità è invece riferita alla capacità della spettroscopia Raman di identificare correttamente i cani senza malattia. Tuttavia, le misure relativamente grezze di sensibilità e specificità

non tengono conto del punto di *cut-off* per un particolare test, come in questo caso (Pence & Mahadevan-Jansen, 2016).

L'area sotto la curva ROC (AUC) rappresenta l'accuratezza complessiva del test diagnostico. Prende valori da 0 a 1, dove un valore 0 indica un test perfettamente impreciso e un valore 1 riflette un test perfettamente accurato (Rub et al., 2013). In generale si considerano:

- AUC = 0,5: nessuna discriminazione, cioè incapacità di diagnosticare pazienti con e senza la malattia;
- AUC da 0,7 a 0,8: accettabile;
- AUC da 0,8 a 0,9: eccellente;
- AUC >0,9: eccezionale.

I punti di *cut-off* ottimali sono stati determinati utilizzando l'indice di Youden. (Ryzhikova et al., 2019), che è una funzione della sensibilità e della specificità. È una misura comunemente usata per valutare l'efficacia diagnostica complessiva. La sensibilità e la specificità per i punti di *cut-off* stabiliti per il rapporto A1/A2 sono stati calcolati con il loro intervallo di confidenza del 95%.

3.2 RISULTATI

Fase 1 – I singoli spettri ottenuti, sia dei campioni provenienti da cani sani (gruppo Controllo) sia di quelli dei cani affetti da leishmaniosi (gruppo Leishmania), hanno mostrato un profilo molto simile. Il primo passo è stato quello di identificare i singoli picchi e le bande, secondo quanto riportato in letteratura. In Figura 2, si riporta uno spettro di riferimento con l'identificazione delle singole zone.

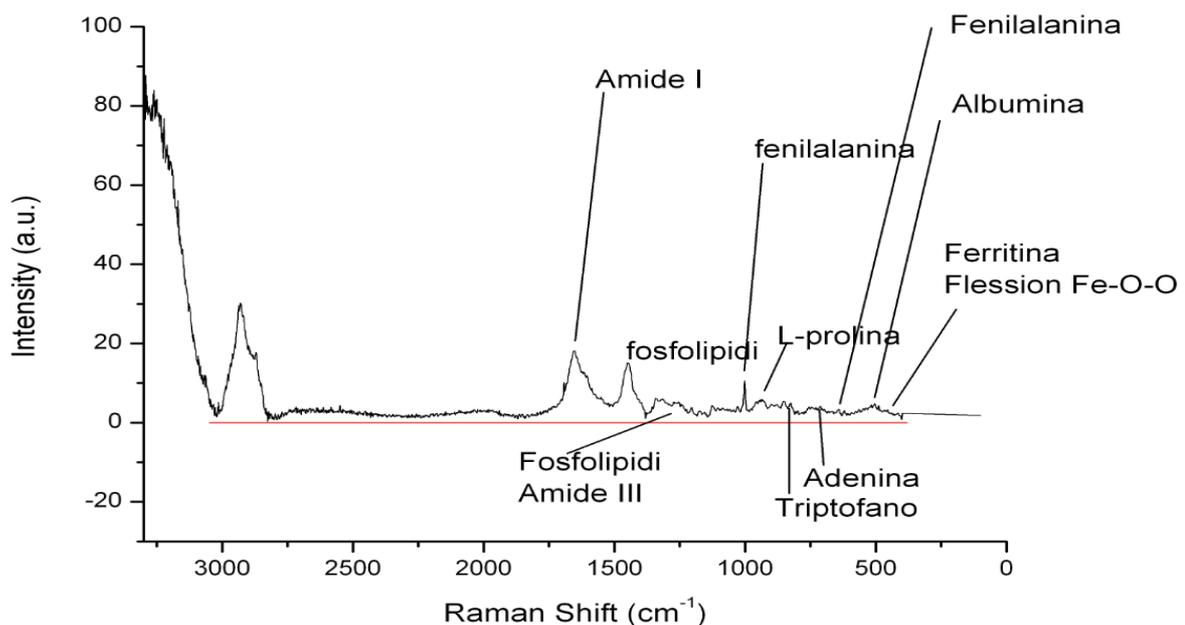


Figura 2: spettro Raman di un campione di siero con identificazione delle singole regioni.

Gli spettri dei campioni considerati sono stati analizzati in *post-processing*. Su ciascun spettro è stato sottratto il fondo e gli spettri sono stati raccolti per gruppo sperimentale, gruppo Controllo (H) e gruppo Leishmania (D). Per ciascun gruppo si è ottenuto lo spettro medio, il quale è stato normalizzato al picco della fenilalanina, poiché lo stesso risultava essere un picco e non una banda. Il risultato ottenuto è rappresentato in Figura 3.

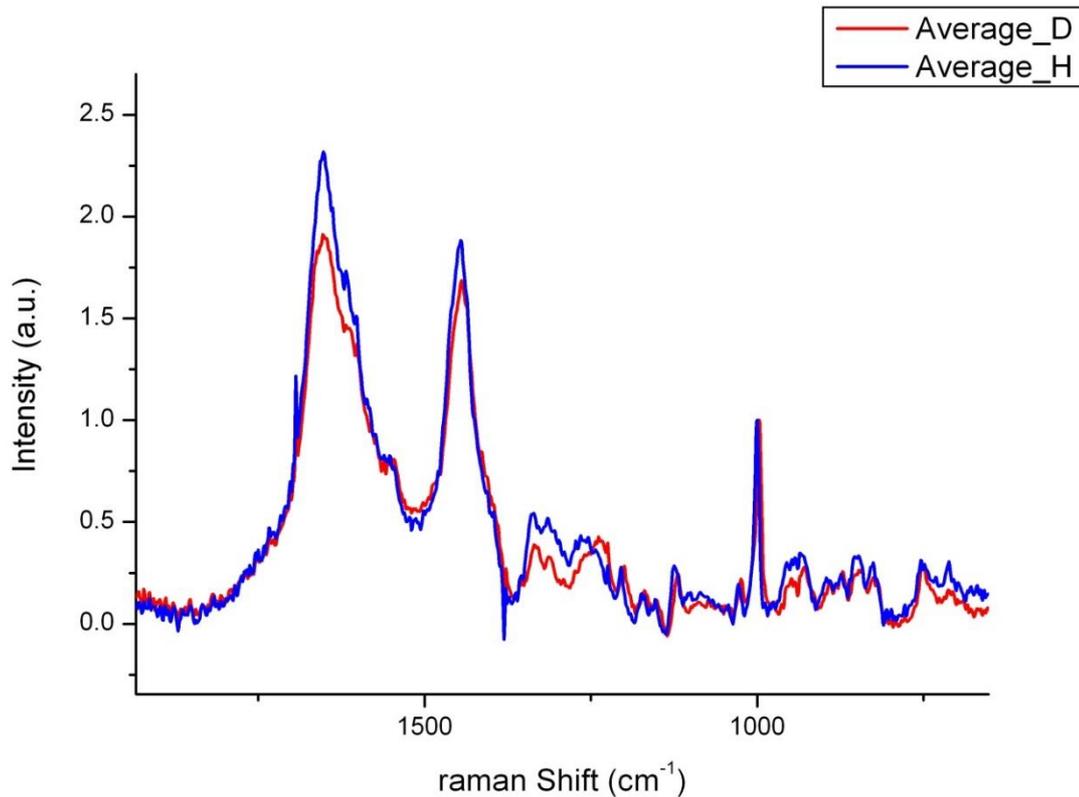


Figura 3: spettro Raman medio dei cani con leishmaniosi (gruppo Leishmania; Average D) e nei cani sani (gruppo Controllo; Average H). La freccia indica la regione interessata dallo *shift* di frequenza (*range* 1.209-1.365 cm^{-1}), riferibile a fosfolipidi e amide III.

Dall'esame comparativo delle curve dei cani sani e quelle dei cani malati così ottenute, sono emerse differenze significative in corrispondenza della regione compresa nel *range* 1.209-1.365 cm^{-1} , dove era evidente uno *shift* in frequenza di circa 35 cm^{-1} . Dal confronto con curve di riferimento presenti in letteratura, le bande in questione riguardavano i picchi relativi a fosfolipidi (Czamara et al., 2014) e amide III (Lalkhen & McCluskey, 2008).

In questa regione, sono state considerate le aree delle due bande A1 (1.209-1.290) cm^{-1} e A2 (1.290-1.365) cm^{-1} , calcolando il rapporto (A1/A2) tra le relative aree sotto la curva e il relativo *cut-off*. Nella Figura 4 è rappresentato il risultato ottenuto:

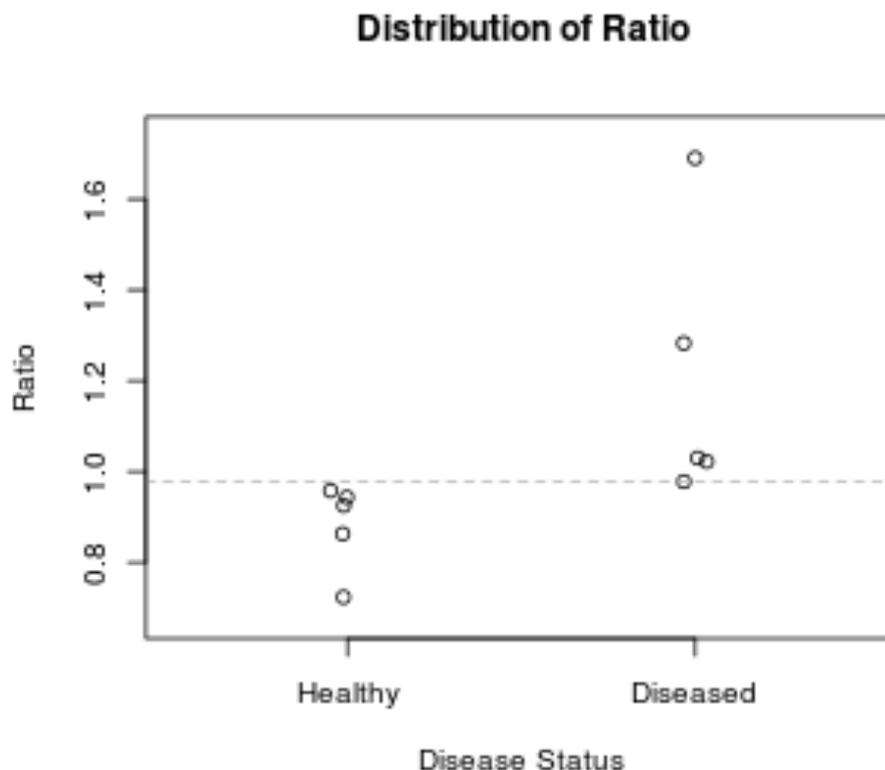


Figura 4: distribuzione del rapporto A1/A2 nei cani sani (Health) e malati (Diseased).

Fase 2 – In seguito alla comparazione con gli spettri di riferimento ottenuti durante la *Fase 1*, gli spettri dei campioni analizzati sono stati attribuiti dall’analista ad uno dei seguenti gruppi:

- a) sano: n. 11 campioni;
- b) malato: n. 12 campioni.

I campioni attribuiti dall’analista al gruppo a) appartenevano a n. 9 animali sani sieronegativi (CG) e a n. 2 cani sieropositivi (titolo 1:160 e 1:320) ma asintomatici (AG); quelli attribuiti al gruppo b), invece, appartenevano a n. 12 cani sieropositivi ad alto titolo (da 1:320 a 1:10.240) e sintomatici (LG), classificabili nello stadio C “Malato”.

In questa fase, gli spettri ottenuti sono stati analizzati considerando la regione 1.200-1.370 cm^{-1} , corrispondente all’amide III (Lalkhen & McCluskey, 2008). Al suo interno, per la valutazione, sono stati presi in considerazione due intervalli: 1.213-

1.279 cm^{-1} e 1.280-1.369 cm^{-1} Il primo corrisponde alla torsione del gruppo CH₂ della leucina e dell'isoleucina (Mandrekar 2010; Marro et al., 2014) e alla deformazione del gruppo C-O-H della leucina, mentre il secondo alla deformazione del gruppo CH della leucina (McLaughlin et al., 2014).

I risultati ottenuti dall'analisi in *post-processing* in questa fase sono illustrati nella Figura 5.

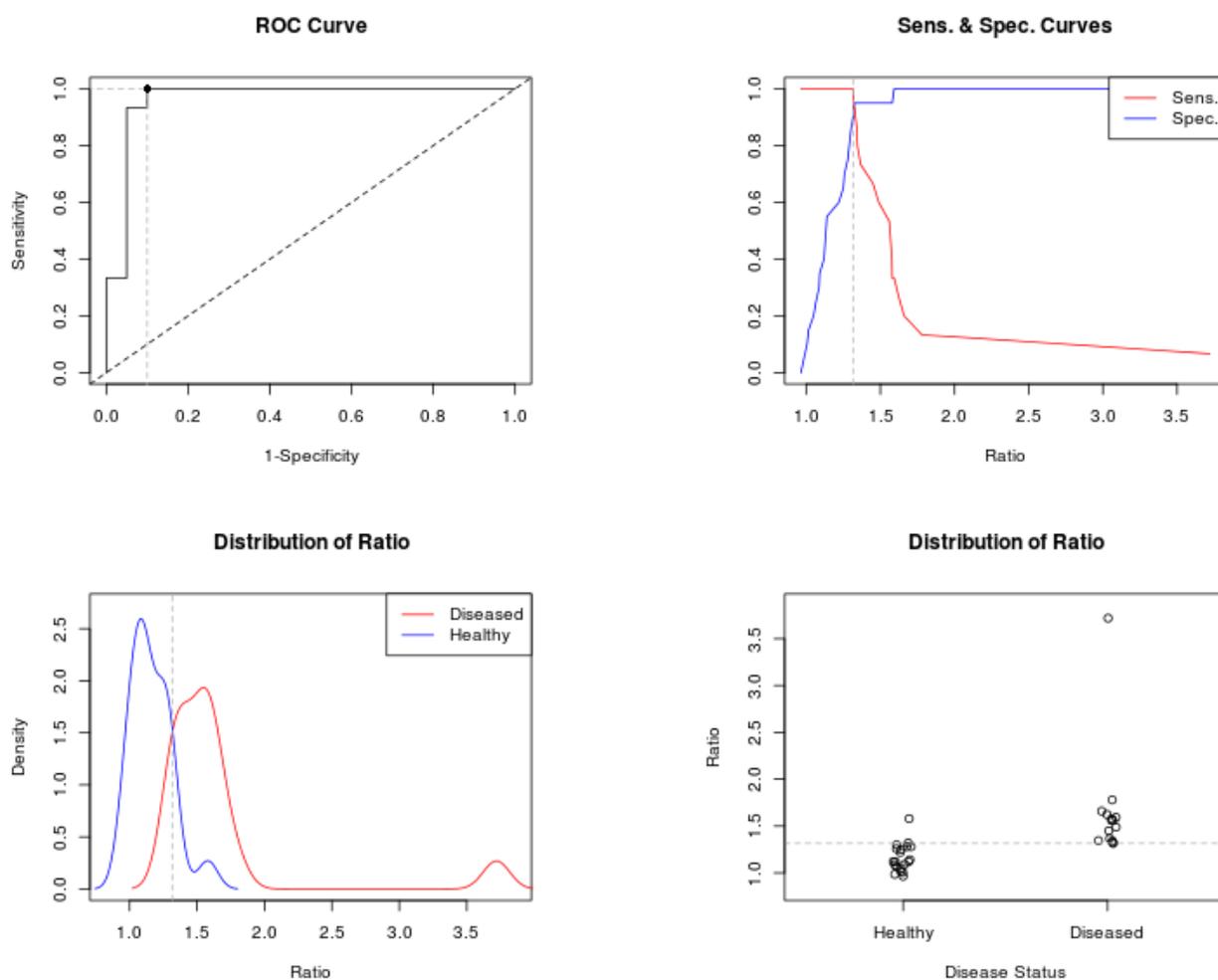


Figura 5: analisi statistica del confronto degli spettri Raman tra cani sani e malati.

La Figura 6 mostra la formula strutturale di leucina e isoleucina.

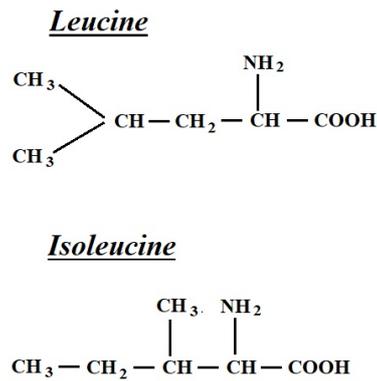


Figura 6: formule strutturali di leucina e isoleucina.

Fase 3 – L’esame degli spettri dei campioni di siero dei cinque cani prelevati nei diversi punti tempo (basale, durante e a fine terapia) ha mostrato una variazione evidente legata al trattamento. Già al prelievo effettuato dopo due settimane di terapia gli spettri erano assimilabili a quelli degli animali sani.

Nella Figura 7, sono riportati i dati dell’AUC relativa alla banda della leucina sullo spettro Raman di ciascun siero prelevato nei diversi punti tempo nei cinque cani.

Il numero esiguo degli animali arruolati in questa fase non ha consentito di effettuare un’analisi statistica attendibile.

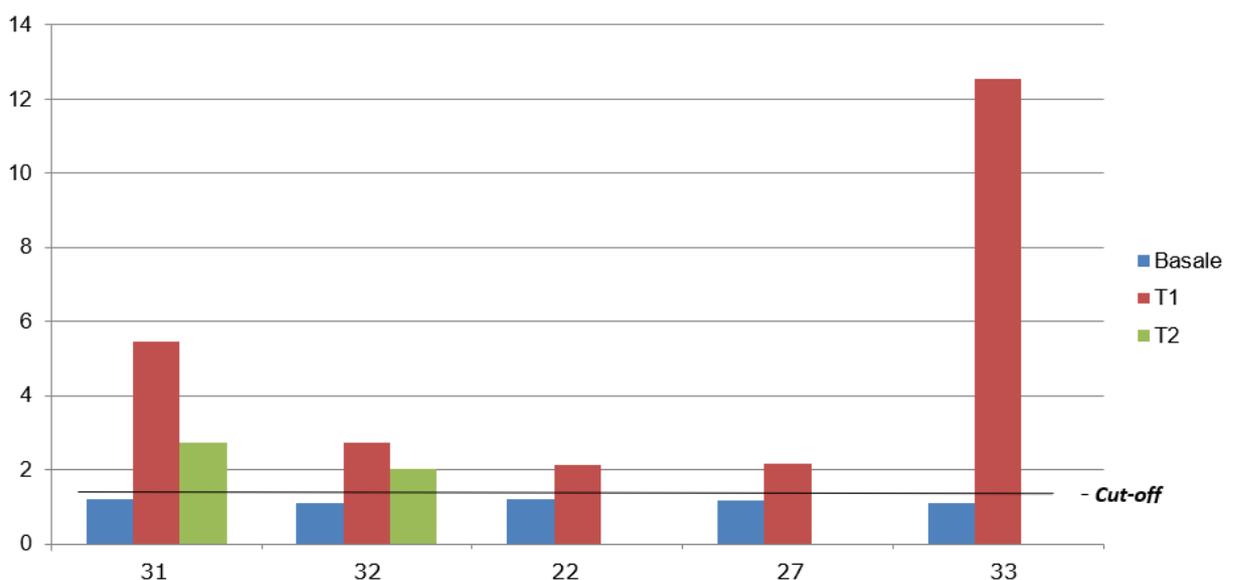


Figura 7: area sotto la curva (AUC) nei diversi tempi di prelievo: alla diagnosi (T0); dopo 2 settimane di terapia (T1) e alla fine del trattamento (T2).

3.3 DISCUSSIONE

Questo studio è stato condotto per verificare l'applicabilità della spettroscopia Raman come metodologia alternativa per la diagnosi della leishmaniosi canina, attualmente piuttosto complessa (Paltrinieri et al., 2010), e fornire un metodo versatile e veloce che permetta di distinguere tra animali sani e malati e possa essere d'ausilio durante il monitoraggio terapeutico.

Gli esiti della ricerca non hanno soddisfatto interamente l'ipotesi, sebbene siano molto interessanti e incoraggianti, visto che gli spettri ottenuti negli animali sani e in quelli affetti da leishmaniosi sono molto omogenei e praticamente sovrapponibili all'interno di ciascun gruppo, con elevata riproducibilità. Di interesse risulta anche la netta differenza in intensità tra gli spettri medi dei due gruppi.

In particolare, gli spettri ottenuti da campioni di siero di animali affetti da leishmaniosi conclamata hanno mostrato caratteristiche impronte molecolari.

I risultati suggeriscono che la spettroscopia Raman possa essere un utile strumento nella diagnosi della leishmaniosi canina, come recentemente riportato in uno studio sperimentale condotto su modelli murini infettati con *L. braziliensis* (Badillo Bedoya, 2018).

Nei cani malati, è stato osservato un evidente spostamento dello spettro Raman nella regione delle onde corte riferibili a fosfolipidi e amide III, in particolare nelle frequenze spettrali della banda centrata a 1.250 cm^{-1} , corrispondente alla regione della leucina (Zhou et al., 2007).

La leucina è una proteina costituente della struttura primaria dell'antigene di superficie parassitario (PSA2), che rappresenta uno dei maggiori antigeni di superficie della membrana del parassita *L. infantum*.

In particolare, nella struttura primaria del PSA2 la più importante componente funzionale è rappresentata da ripetizioni ricche di leucina (LLR).

Una ripetizione ricca di leucina è un motivo strutturale proteico che forma una piega a ferro di cavallo, composto da 20-30 ripetizioni di aminoacidi ricchi di leucina aminoacidica idrofobica.

Queste ripetizioni, in tandem, si piegano comunemente per formare un dominio proteico solenoide chiamato dominio ripetuto ricco di leucina.

È noto come le LRR siano primariamente coinvolte nelle interazioni proteina-proteina e proteina-glicolipidi tra patogeni e ospite (Kedzierski et al, 2004).

Sembra che, grazie a queste interazioni, l'amastigote di *Leishmania* spp. interagisca con i macrofagi dell'ospite e possa così resistere alla lisi da parte del sistema del complemento (Kedzierski et al, 2004).

Alcuni autori hanno riportato che le LRR rappresentano i principali epitopi nella PSA di *L. infantum* responsabile della leishmaniosi viscerale canina ed umana. Sembra che la regione centrale del PSA, formata esclusivamente da LRR, abbia una capacità antigenica molto elevata. Tale componente è stata riconosciuta nel 100% dei sieri provenienti da cani infetti e nel 40% dei sieri umani. Probabilmente, le LRR rappresentano i determinanti immunogenici del PSA durante l'infezione naturale da *Leishmania* spp., quali responsabili della risposta anticorpale dell'ospite (Boceta et al., 2000).

Nei mammiferi, l'interazione ospite-leishmania implica l'adesione ai macrofagi dell'ospite e la loro invasione, inizialmente da parte dei promastigoti meteciclici e successivamente dagli amastigoti. Quest'interazione parassita-macrofago avviene attraverso la membrana di superficie del parassita, costituita da strati di glicolipidi (lipofosfoglicani e proteofosfoglicani) e proteine (maggior proteina di superficie o glicoproteina 63-kDa, antigene di superficie parassitario-2 o glicoproteina 46-kDa e proteine di superficie (amastine) (Devault et Banuls 2008).

La modificazione dello spettro Raman dell'amide III e in particolare nella regione della leucina osservato nei soggetti malati potrebbe essere correlata ai meccanismi di interazione ospite parassita.

Lo *shift* in frequenza nella regione dei fosfolipidi osservato nello spettro Raman degli animali affetti da leishmaniosi sembra confermare, inoltre, il ruolo chiave del metabolismo lipidico nella patogenesi della malattia, in accordo con quanto riportato dalla recente bibliografia (Arish et al., 2018; Gonzaga dos Santos et al., 2013; Rub et al., 2013; Di Loria et al., 2020).

In particolare, è stato osservato che, durante l'infezione da *Leishmania* spp., l'alterazione del metabolismo lipidico, che coinvolge il trasferimento, l'accumulo e la modificazione dei lipidi, rappresenta un punto cruciale nella progressione della malattia (Rub et al., 2013).

La membrana plasmatica di *Leishmania* spp. è costituita da un glicocalice, formato da glicoconiugati ancorati alla membrana plasmatica tramite glicosilfosfatidilinositolo (GPI). I glicoconiugati sono glicoproteine, in particolare proteofosfoglicano (PPG) e zinco-metalloproteasi GP63 (chiamata anche leishmanolisina), e glicolipidi, mentre il lipofosfoglicano (GPL) è il più abbondante (Hornemann et al., 2017).

Nei mammiferi, l'interazione ospite-*Leishmania* coinvolge l'attaccamento e l'invasione dei macrofagi ospiti, inizialmente dei promastigoti metaciclici e successivamente degli amastigoti. La *Leishmania* compromette in modo selettivo le vie di segnalazione cellulari dell'ospite, punto critico per il successo della sua crescita e proliferazione all'interno delle cellule stesse (Arango Duque et al., 2015). In particolare, è stato dimostrato che l'alterazione delle vie del metabolismo lipidico, il trasferimento, la modificazione e l'accumulo dei lipidi durante l'infezione da *Leishmania* spp. sono un punto chiave nella progressione della malattia (Rub et al., 2013). L'infezione da *Leishmania* spp. porta ad un aumento della produzione di ceramide dal colesterolo di membrana e interrompe il trasporto lipidico transmembrana (Majumder et al., 2012; Rub et al., 2013).

Per l'invasione delle cellule dell'ospite, entrambe le forme parassitarie utilizzano la fagocitosi mediata da recettore. In questo processo, s'ipotizza che il fosfolipide

fosfatidilserina (PS) rappresenti un ligando cruciale del parassita. Anche se alcuni studi suggeriscono che le diverse specie di *Leishmania* manchino di PS, il rilevamento dei lipidi della superficie cellulare mediante colorazione con annessina V marcata, una proteina che interagisce con la PS ma anche con l'acido fosfatidico e il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato, è coerente con l'ipotesi che il protozoo potrebbe trarre vantaggio, per invadere e sopravvivere nei macrofagi ospiti, da una visualizzazione superficiale regolamentata di lipidi specifici (Gonzaga dos Santos et al., 2013).

Tipicamente, la membrana plasmatica eucariotica mostra una distribuzione asimmetrica dei fosfolipidi attraverso il doppio strato, con la PS e la fosfatidiletanolamina (PE) limitate al foglietto citoplasmatico e gli sfingolipidi concentrati nel foglietto esoplasmatico. Questa distribuzione è mantenuta dalle flippasi, gli enzimi di traslocazione dei fosfolipidi appartenenti alla classe delle idrolasi. Infatti, i fosfolipidi, provvisti di una componente (testa) polare, non sono in grado di attraversare l'interno del doppio strato idrofobico della membrana, sebbene siano in grado di diffondere liberamente attraverso il piano della membrana stessa. I fosfolipidi, pertanto, dopo essere stati sintetizzati nel citoplasma, si accumulano a livello del versante interno (citoplasmatico) della membrana, per poi interagire con le flippasi che li trasportano sul lato esterno. Tale trasferimento, contro gradiente di concentrazione, è un processo di trasporto attivo che richiede energia e avviene tramite l'idrolisi di ATP. L'azione delle flippasi è importante al fine di mantenere un'asimmetria funzionale nella composizione lipidica tra i due strati della membrana. La perdita di tale asimmetria, in seguito ad un malfunzionamento delle flippasi, o di altri fattori, può avere conseguenze gravi per la cellula, e portare ad apoptosi. Oltre alle flippasi, alcune cellule eucariotiche contengono una scramblasi fosfolipidica, una proteina di membrana putativa che quando si attiva facilita un movimento di fosfolipidi bidirezionale rapido attraverso i due foglietti di membrana, interrompendo l'asimmetria lipidica creata dalle flippasi ATP-dipendenti.

Le conoscenze scientifiche sulle dinamiche trans-membrana dei fosfolipidi e sul coinvolgimento delle proteine della membrana plasmatica di *Leishmania* spp. sono limitate. Resta ancora da stabilire come le differenze di attività e la specificità delle attività di trasporto dei fosfolipidi verso l'interno riguardino l'asimmetria dei lipidi di membrana. Alcuni studi hanno evidenziato l'attività di enzimi coinvolti nella traslocazione fosfolipidica in *L. infantum*, *L. donovani* e *L. tropica*. Inoltre, la stimolazione di *L. donovani* con ionofori di calcio ha evidenziato l'innescò dell'attività di scramblasi fosfolipidica che facilita il movimento bidirezionale di fosfolipidi indipendente dall'ATP cellulare. Il meccanismo attraverso il quale agisce la miltefosina, un alchilfosfolipide analogo della fosfatidilcolina, utilizzata nel trattamento della leishmaniosi, è strettamente correlato al meccanismo delle flippasi, mediante il quale i lipidi vengono traslocati attraverso le membrane (Gonzaga dos Santos et al., 2013).

E' noto, inoltre, che l'alterazione del trasporto lipidico indebolisce la "trasduzione del segnale" mediata dalla glicoproteina CD 40 (*cluster of differentiation 40*), che porta ad un aumento della fosforilazione di ERK (*extracellular regulated kinase*) 1 e 2, proteine del citosol appartenenti alla famiglia delle MAP (*mitogen-activated protein kinase*) capaci di traslocare nel nucleo, e ad una ridotta presentazione dell'antigene alle cellule T, peggiorando la condizione di malattia (Majumder et al., 2012; Rub et al., 2009).

Recenti ricerche (Arish et al., 2018) condotte su linee cellulari monocitarie umane (TDM) infettate con *L. donovani* hanno evidenziato come la "via di segnalazione" sia alterata dall'infezione, mostrando una diminuzione dell'espressione di S1PR 2 e 3, recettori per la sfingosina 1-fosfato (S1P), a livello di mRNA e un'inibizione dell'attivazione della sfingosina chinasi (SPK) 1, che catalizza la produzione di S1P. La S1P è un lipide bioattivo appartenente alla famiglia delle "proteine G" (*guanosine triphosphate binding proteins*, GTP-BPs) accoppiate a recettori S1PR. La S1P è una molecola di segnalazione che si sta dimostrando cruciale nella regolazione cellulare, capace di governare una miriade di eventi di segnalazione a valle, quali apoptosi e

proliferazione, migrazione e differenziazione cellulare. La “cascata biochimica” inizia con la generazione di S1P dalla sfingosina per azione della SPK. Successivamente, la S1P trasloca sulla membrana esterna e si lega ai suoi recettori, S1PR 1-5, che innescano le piccole proteine G ad essi associate. Le GTP-BPs attivano poi diverse proteine di segnalazione con varie funzioni effettrici (Arish et al., 2016; Husein et al., 2018).

Anche le proteasi prodotte da *Leishmania* spp., in particolare metalloproteasi (es., leishmanolisina) e proteasi a cisteina (es., amastine), sono state proposte come fattori di virulenza che contribuiscono al successo adattativo del parassita nei confronti del mammifero ospite. Il loro ruolo nella patogenesi della leishmaniosi è stato evidenziato in modelli murini, nell’uomo e di recente anche in cani naturalmente infetti con *L. (L.) infantum*. In particolare, tutti i cani infetti presentano alterazioni delle metalloproteasi ma solo quelli polisintomatici presentano elevati livelli di proteasi a cisteina (Barral Veloso et al., 2020).

La carica parassitaria, che correla bene con lo stato clinico, può essere un fattore limitante per rilevare l'infezione, soprattutto nelle fasi iniziali e nei cani asintomatici. I risultati della presente ricerca, tuttavia, sembrano evidenziare un limite nella sensibilità della metodica nei cani sieropositivi asintomatici (AG), i cui spettri Raman sono risultati sovrapponibili a quelli del gruppo controllo (CG). Il numero troppo esiguo di animali (n=2), tuttavia, non permette di formulare considerazioni conclusive e saranno necessarie ulteriori indagini in coorti di cani, numericamente significative, differenziate per stato clinico e titolo anticorpale e/o carica parassitaria (es., PCR quantitativa).

Un altro limite della ricerca è la presenza di soli animali sani e con infezione da *L. infantum*. Per confermare che il metodo è utile per la diagnosi di leishmaniosi e per dimostrarne la specificità è necessario includere altri gruppi di malattie (es., neoplastiche, infiammatorie, altre malattie infettive, d’organo, ecc.). Sebbene sia inequivocabile la capacità di distinzione tra animali sani e malati, non è possibile

escludere che la variazione dello spettro Raman possa essere connessa ad una perturbazione organica/metabolica piuttosto che alla specifica malattia.

Molto incoraggianti, invece, risultano i dati relativi al monitoraggio degli animali trattati, che dimostrano un'evidente modificazione degli spettri già dopo due settimane di terapia. Sarà utile approfondire le ricerche aumentando il numero degli animali e mettendo in correlazione le variazioni dello spettro con i diversi trattamenti (es., miltefosina) e le modificazioni degli altri esami di laboratorio, in particolare PCR quantitativa e profilo elettroforetico.

Sulla base di quanto detto, il *gold standard* per la diagnosi della leishmaniosi canina rimane l'esame clinico, associato ad accurati esami di laboratorio (ematologici, ematochimici, urinari, sierologici, molecolari), dispendiosi in termini di tempo e di costi.

3.4 CONCLUSIONI

In definitiva, la spettroscopia Raman ha dimostrato di essere una tecnica di facile esecuzione, rapida, riproducibile e non invasiva, e di poter essere uno strumento utile nella leishmaniosi canina sia in fase diagnostica che prognostico/terapeutica, sebbene siano necessarie ulteriori indagini per confermare pienamente quanto osservato in questo studio preliminare.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbate JM, Arfuso F, Napoli E, Gaglio G, Giannetto S, Latrofa MS, Otranto D, Brianti E. *Leishmania infantum* in wild animals in endemic areas of southern Italy. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 67:101374, 2019.
2. Acedo-Sánchez C, Morillas-Márquez F, Sanchíz-Marín MC, Martín-Sánchez J. Changes in antibody titers against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in Southern Spain. *Veterinary Parasitology*. 75(1):1-8, 1998.
3. Aciri G, Romano C, Costa S, Pellegrino S, Testagrossa B. Raman Spectroscopy Technique: A Non-Invasive Tool in Celiac Disease Diagnosis. *Diagnostics (Basel)*. 16;11(7):1277, 2021a.
4. Aciri G, Testagrossa B, Giudice E, Arfuso F, Piccione G, Giannetto C. Application of Raman Spectroscopy for the Evaluation of Metabolomic Dynamic Analysis in Athletic Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 96:103319, 2021b.
5. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of Immunology*. 169(2):898-905, 2002.
6. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmani* parasites and sandflies *PLoS neglected tropical diseases*. 10:e0004349, 2016.
7. Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Medical and veterinary entomology*. 17(1):1-18, 2003.
8. Alexandre-Pires G, de Brito MT, Alguero C, Martins C, Rodrigues OR, da Fonseca IP, Santos-Gomes G. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary immunology and immunopathology*. 137(3-4):275-83, 2010.
9. Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*. 127(3-4):227-32, 2005.
10. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 7(5): e35671, 2012.

11. Arango Duque G, Descoteaux A. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Current opinion in microbiology*. 26:32-40, 2015.
12. Arish M, Husein A, Ali R, Tabrez S, Naz F, Ahmad MZ, Rub A. Sphingosine-1-phosphate signaling in Leishmania donovani infection in macrophages. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 12(8):e0006647, 2018.
13. Asfaram S, Fakhar M, Teshnizi SH. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 25:e20190012, 2019.
14. Atkins CG, Buckley K, Blades MW, Turner RFB. Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components. *Applied Spectroscopy's*. 71(5):767-793, 2017.
15. Auner GW, Koya SK, Huang C, Broadbent B, Trexler M, Auner Z, Elias A, Mehne KC, Brusatori MA. Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer Metastasis Review*. 37(4):691-717, 2018.
16. Azami-Conesa I, Gómez-Muñoz MT, Martínez-Díaz RA. A Systematic Review (1990-2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic Leishmania. *Microorganisms*. 9(5):1101, 2021.
17. Badillo Bedoya MA. Análisis de sueros sanguíneos de ratón infectado con Leishmania braziliensis empleando Espectroscopía Raman Intensificada por Efecto de Superficie (SERS). Tesis de grado. Universidad industrial de Santander, Bucaramanga, 2018.
18. Baldelli R, Piva S, Salvatore D, Parigi M, Melloni O, Tamba M, Bellini R, Poglayen G. Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel. *Veterinary Parasitology*. 179(1-3):57-61, 2011.
19. Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Journal of Advances in Parasitology*. 64:1-109, 2007.
20. Barral-Veloso L, Melo BCA, Santos-de-Souza R, Cysne-Finkelstein L, Souza-Silva F, Santos FN, Sousa JF, Alves CR. Reactivity of sera from dogs living in a leishmaniasis-endemic area to the COOH-terminal region of cysteine proteinase. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 24(3):201-207, 2020.
21. Bates PA. Revising Leishmania's life cycle. *Nature Microbiology*. 3(5):529-530, 2018.
22. Ben Slimane T, Chouihi E, Ben Hadj Ahmed S, Chelbi I, Barhoumi W, Cherni S, Zoghalmi Z, Gharbi M, Zhioua E. An investigation on vertical transmission of Leishmania infantum in experimentally infected dogs and assessment of offspring's infectiousness potential by xenodiagnoses. *Veterinary Parasitology*. 206(3-4): 282-286, 2014.

23. Berger AJ, Itzkan I, Feld MS. Feasibility of Measuring Blood Glucose Concentration by Near-Infrared Raman Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 53(2): 287–292, 1997.
24. Berger AJ, Koo TWW, Itzkan I, Horowitz G, Feld MS. Multicomponent Blood Analysis by Near-Infrared Raman Spectroscopy. *Application*. 38(13): 2916–2926, 1999.
25. Bergholt MS, Hassing S. Quantification of C-reactive protein in human blood plasma using near-infrared Raman spectroscopy. *Analyst*. 134(10):2123-7, 2009.
26. Bergholt MS, Zheng W, Ho KY, Teh M, Yeoh KG, Yan So JB, Shabbir A, Huang Z. Fiberoptic confocal raman spectroscopy for real-time in vivo diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 146(1):27-32, 2014.
27. Birtoiu IA, Rizea C, Togoe D, Munteanu RM, Micsa C, Rusu MI, Tautan M, Braic L, Scoicaru LO, Parau A, Becherescu-Barbu ND, Udrea MV, Tonetto A, Notonier R, Grigorescu CE. Diagnosing clean margins through Raman spectroscopy in human and animal mammary tumour surgery: a short review. *Interface Focus*. 6(6):20160067, 2016.
28. Boceta C, Alonso C, Jiménez-Ruiz A. Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite immunology*. 22(2):55-62, 2000.
29. Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, Petersen CA. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS neglected tropical diseases* 5(4): e1019, 2011.
30. Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Solari Basano F, Latrofa MS, Tarallo VD, Dantas-Torres F, Capelli G, Stanneck D, Giannetto S, Otranto D. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%) /flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniasis. *Parasites & vectors*. 7:327, 2014.
31. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 392(10151):951-970, 2018.
32. Buschman HP, Marple ET, Wach ML, Bennett B, Schut TC, Bruining HA, Brusckhe AV, van der Laarse A, Puppels GJ. In vivo determination of the molecular composition of artery wall by intravascular Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 72(16):3771-5, 2000.
33. Buschman HP, Motz JT, Deinum G, Römer TJ, Fitzmaurice M, Kramer JR, van der Laarse A, Brusckhe AV, Feld MS. Diagnosis of human coronary atherosclerosis by morphology-based Raman spectroscopy. *Cardiovascular Pathology*. 10(2):59-68, 2001.

34. Butler HJ, Ashton L, Bird B, Cinque G, Curtis K, Dorney J, Esmonde-White K, Fullwood NJ, Gardner B, Martin-Hirsch PL, Walsh MJ, McAinsh MR, Stone N, Martin FL. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*. 11: 664-687, 2016.
35. Cacheiro-Llaguno C, Parody N, Renshaw-Calderón A, Osuna C, Alonso C, Carnés J. Vaccination with LetiFend® reduces circulating immune complexes in dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vaccine*. 38(4):890-896, 2020.
36. Calzolari M, Carra E, Rugna G, Bonilauri P, Bergamini F, Bellini R, Varani S, Dottori M. Isolation and Molecular Typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus perfiliewi* in a Re-Emerging Focus of Leishmaniasis, Northeastern Italy. *Microorganisms*. 7(12):644, 2019.
37. Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, Genchi C, Gradoni L, Gramiccia M, Maroli M, Mortarino M, Pietrobelli M, Rossi L, Ruggiero M. Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parassitologia* 46(1-2):193-7, 2004.
38. Carlomagno C, Cabinio M, Picciolini S, Gualerzi A, Baglio F, Bedoni M. SERS-based biosensor for Alzheimer disease evaluation through the fast analysis of human serum. *Journal of Biophotonics*. 13(3): e201960033, 2020.
39. Carlsen ED, Liang Y, Shelite TR, Walker DH, Melby PC, Soong L. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clinical Experimental Immunology*. 182(2):109-18, 2015.
40. Carrillo E, Moreno J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*. 128(1-3):67-70, 2009.
41. Castagnaro M, Crotti A, Fondati A, Gradoni L, Lubas G, Maroli M, Oliva G, Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Leishmaniosi canina: Linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte I: Approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico. *Veterinaria*. 21, 19–32, 2007.
42. Chamizo C, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*. 10;103(1-2):67-75, 2005.
43. Christelle Fontaine, Moreno J, Vouldoukis I, Senseby F, De Mari K, Gueguen S, Cuisinier AM. Comparison of the Th1-mediated immunity induced by two anti-Leishmaniosis vaccines in dogs. Poster at the 29th International Conference on Vaccines and Immunization. London, UK. March 19-20, 2018.
44. Cortese L, Sica M, Piantedosi D, Ruggiero G, Pero ME, Terrazzano G, Mastellone V, Ciaramella P. Secondary immune-mediated thrombocytopenia

- in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*. 164(25):778-82, 2009.
45. Cortese L, Terrazzano G, Piantedosi D, Sica M, Prisco M, Ruggiero G, Ciaramella P. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Veterinary Journal*. 188(1):118-21, 2011.
 46. Crow P, Uff JS, Farmer JA, Wright MP, Stone N. The use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma in vitro. *BJU International*. 93(9):1232-6, 2004.
 47. Czamara K, Majzner K, Pacia MZ, Kochan K, Kaczor A, Baranska M. Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*. 46(1): 4-20, 2015.
 48. Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo L A, Stanneck D, et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Reserch*. 106: 857–60, 2010.
 49. Dantas-Torres F, Miró G, Baneth G, Bourdeau P, Breitschwerdt E, Capelli G, Cardoso L, Day MJ, Dobler G, Ferrer L, Irwin P, Jongejan F, Kempf VAJ, Kohn B, Lappin M, Little S, Madder M, Maggi R, Maia C, Marcondes M, Naucke T, Oliva G, Pennisi MG, Penzhorn BL, Peregrine A, Pfeffer M, Roura X, Sainz A, Shin S, Solano-Gallego L, Straubinger RK, Tasker S, Traub R, Wright I, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. *Emerging Infectious Disease*. 25(12):1-4, 2019.
 50. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*. 28(12):531-8, 2012.
 51. Das M, Roy L, Picado A, Kroeger A, Rijal S, Boelaert M. Deltamethrin and permethrin residue on long-lasting insecticidal nets after 18 months of use in a visceral leishmaniasis-endemic area in Nepal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 106(4):230-4, 2012.
 52. Das RS, Agrawal YK. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy*. 57:163–176, 2011.
 53. De Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dog: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*. 137(1-2):159-67, 2006.
 54. De Menezes JP, Saraiva EM, da Rocha-Azevedo B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasites & Vectors*. 9:264, 2016.

55. De Tommasi AS, Otranto D, Furlanello T, Tasca S, Cantacessi C, Breitschwerdt EB, Stanneck D, Dantas-Torres F, Baneth G, Capelli G, de Caprariis D. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. *Parasite Vectors*, 7:534, 2014.
56. De Vasconcelos TCB, Furtado MC, Belo VS, Morgado FN, Figueiredo FB. Canine susceptibility to visceral leishmaniasis: a systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. *Infection, Genetics and Evolution*, 74: 103293, 2019.
57. Desroches J, Jermyn M, Pinto M, Picot F, Tremblay MA, Obaid S, Marple E, Urmeiy K, Trudel D, Soulez G, Guiot MC, Wilson BC, Petrecca K, Leblond F. A new method using Raman spectroscopy for in vivo targeted brain cancer tissue biopsy. *Scientific Reports*. 8(1): 1792, 2018.
58. Devault A, Bañuls AL. The promastigote surface antigen gene family of the *Leishmania* parasite: differential evolution by positive selection and recombination *BMC evolutionary biology*. 8:292, 2008.
59. Dingari NC, Barman I, Kang JW, Kong CR, Dasari RR, Feld MS. Wavelength Selection-Based Nonlinear Calibration for Transcutaneous Blood Glucose Sensing Using Raman Spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 16(8): 87009, 2011.
60. Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Veterinary Pathology*. 42(5):650-8, 2005.
61. Dipineto L, Manna L, Baiano A, Gala M, Fioretti A, Gravino AE, Menna LF. Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. *Journal of Wildlife Diseases*. 43(3):518-20, 2007.
62. Dí'az-Espineira MM, Slappendel RJ. A case of autochthonous canine leishmaniasis in The Netherlands. *Veterinary Quarterly*. 19(2):69-71, 1997.
63. Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, Vries PJ de. Miltefosine. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67 (11): 2576–2597, 2012.
64. dos Santos MG, Muxel SM, Zampieri RA, Pomorski TG, Floeter-Winter LM. Transbilayer dynamics of phospholipids in the plasma membrane of the *Leishmania* genus. *PLoS One*. 8(1):e55604, 2013.
65. Dou X, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Uenoyama H, Ozaki Y. Biological Applications of Anti-Stokes Raman Spectroscopy: Quantitative Analysis of Glucose in Plasma and Serum by a Highly Sensitive Multichannel Raman Spectrometer. *Applied Spectroscopy*. 50(10): 1301–1306, 1996.

66. Duarte J, Pacheco MT, Villaverde AB, Machado RZ, Zangaro RA, Silveira L Jr. Near-infrared Raman spectroscopy to detect anti-*Toxoplasma gondii* antibody in blood sera of domestic cats: quantitative analysis based on partial least-squares multivariate statistics. *Journal of Biomedical Optics*. 15(4): 047002, 2010.
67. Eberhardt K, Stiebing C, Matthäus C, Schmitt M, Popp J. Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 15(6):773-87, 2015.
68. Edrissian G, Rokni MB, Mohebbali M, Nateghpour M, Mowlavi G, Bahadori M. History of medical parasitology and parasitic infections in Iran. *Archives of Iranian medicine*. 19(8):601-7, 2016.
69. Enejder A, Seccina T, Oh J, Hunter M, Shih W, Sasic S, Horowitz GL, Feld MS. Raman Spectroscopy for Noninvasive Glucose Measurements. *Journal of Biomedicine*. 10(3): 31114, 2005.
70. Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *Journal of immunology*. 191(11):5542-50, 2013.
71. Escobar TA, Dowich G, Dos Santos TP, Zuravski L, Duarte CA, Lübeck I, Manfredini V. Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations in a canine visceral leishmaniasis transmission area. *BMC Veterinary Research*. 15(1):381, 2019.
72. Farber C, Morey R, Krimmer M, Kurouski D, Rogovskyy AS. Exploring a possibility of using Raman spectroscopy for detection of Lyme disease. *Journal of Biophotonics*. 14(5): e202000477, 2021.
73. Ferroglio E, Maroli M, Castaldo S, Trisciuglio, Raimondo C, Veysendaz E, Saracco M, Rossi L. Survey of phlebotomine sandflies in North-West Italy. *Parassitologia*. 44 (1): 66, 2002.
74. Font A, Closa JM, Mascort J. Monoclonal gammopathy in a dog with visceral leishmaniasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 8(3):233-5, 1994.
75. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*. 10(2):238-45, 2010.
76. Frosch T, Yan D, Popp J. Ultrasensitive fiber enhanced UV resonance Raman sensing of drugs. *Analytical Chemistry*. 85(13):6264-71, 2013.
77. Galati EAB. Classificacao de Phlebotominae. In: *Rangel ER, Lainson R, editors. Flebotomineos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. p. 23–52. 367pp, 2003.*

78. Galli R, Preusse G, Uckermann O, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Koch E, Steiner G. In Ovo Sexing of Domestic Chicken Eggs by Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry journal*. 88(17):8657-63, 2016.
79. Gálvez R, Montoya A, Fontal F, Martínez De Murguía L, Miró G. Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: a case of knowing your enemy. *Research in veterinary science*. 121:94–103, 2018.
80. Gazzoni AL, Bertero F, Moretta I, Morganti G, Mortarino M, Villa L, Zanzani SA, Morandi B, Rinnovati R, Vitale F, Manfredi MT, Cardoso L, Veronesi F. Detecting antibodies to *Leishmania infantum* in horses from areas with different epizooticity levels of canine leishmaniosis and a retrospective revision of Italian data. *Parasites & Vectors*. 13(1):530, 2020.
81. Gibson-Corley KN, Boggiatto PM, Mukbel RM, Petersen CA, Jones DE. A deficiency in the B cell response of C57BL/6 mice correlates with loss of macrophage-mediated killing of *Leishmania amazonensis*. *International journal for parasitology*. 40(2):157-61, 2010.
82. Gibson-Corley KN, Hostetter JM, Hostetter SJ, Mullin K, Ramer-Tait AE, Boggiatto PM, Petersen CA. Disseminated *Leishmania infantum* infection in two sibling foxhounds due to possible vertical transmission. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire Canadienne*. 49(10):1005-8, 2008.
83. Giger U, Oakley DA, Owens SD, Schantz P. *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion*. 42(3):381-3, 2002.
84. Giner J, Basurco A, Alcover MM, Riera C, Fisa R, López RA, Juan-Sallés C, Verde MT, Fernández A, Yzuel A, Villanueva-Saz S. First report on natural infection with *Leishmania infantum* in a domestic ferret (*Mustela putorius furo*) in Spain. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*. 19:100369, 2020.
85. Gradoni L, Gramiccia M. Leishmaniasis. *OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccine*. 4th ed. Paris: Office International des Epizooties. 803–812, 2000.
86. Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M, Mancianti F. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Medical and Veterinary Entomology*. 1(4):339-42, 1987.
87. Gradoni L, Oliva G, Ferroglio E, Capelli G, Cassini R, Mignone W, Minetti E, Furlanello T. *Leishmania* 2020: rapporto aggiornato sull'espansione della leishmaniosi in Italia. SCIVAC Rimini web, 25-29 Maggio 2021.
88. Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T, Orsini S, Fiorentino E, Gradoni L. The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009. *Euro*

- surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles*. 18(29):20535, 2013.
89. Gramiccia M. Old world leishmaniasis. *Annali Istituto Superiore della Sanità*. 33.2: 231-239, 1997.
 90. Grinnage-Pulley T, Scott B, Petersen CA. A Mother's Gift: Congenital Transmission of Trypanosoma and Leishmania Species. *PLoS Pathogens*. 12(1): e1005302, 2016.
 91. Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS. Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy. *Cancer Reserch*. 62(18):5375-80, 2002.
 92. Handman E, Bullen DV. Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends in Parasitology*. 18(8):332-4, 2002.
 93. Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M, Kramer JR, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*.45(2): R1-59, 2000.
 94. Hoare CA. Early discoveries regarding the parasite of oriental sore. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 32(1), 66-92, 1938.
 95. Holzmuller P, Cavaleyra M, Moreaux J, Kovacic R, Vincendeau P, Papierok G, Lemesre JL. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of Leishmania infantum co-incubated with Leishmania infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 106(3-4):247-57, 2005.
 96. Honse CO, Figueiredo FB, de Alencar NX, Madeira M. de F, Gremião ID, Schubach TM. Disseminated intravascular coagulation in a dog naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi from Rio de Janeiro Brazil. *BMC veterinary research*. 9:43, 2013.
 97. Hornemann A, Sinning D, Cortes S, Campino L, Emmer P, Kuhls K, Ulm G, Frohme M, Beckhoff B. A pilot study on fingerprinting Leishmania species from the Old World using Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(29):6907-6923, 2017.
 98. Horsnell JD, Smith JA, Sattlecker M, Sammon A, Christie-Brown J, Kendall C, Stone N. Raman spectroscopy a potential new method for the intra-operative assessment of axillary lymph nodes. *Surgeon*. 10(3):123-7, 2012.
 99. Hosein S, Blake DP, Solano-Gallego L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology*. 144(1): 95-115, 2017

- 100.Hsu PH, Chiang HK. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Quantitative Measurement of Lactic Acid at Physiological Concentration in Human Serum. *Journal of Raman Spectroscopy*. 41(12): 1610–1614, 2010.
- 101.Huang Z, McWilliams A, Lui H, McLean DI, Lam S, Zeng H. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *International Journal of Cancer*. 107(6):1047-52, 2003.
- 102.Husein A, Jamal A, Ahmed MZ, Arish M, Ali R, Tabrez S, Rasool F, Rub A. Leishmania donovani infection differentially regulates small G-proteins. *Journal of cellular biochemistry*. 119(9):7844-7854, 2018.
- 103.Iatta R, Furlanello T, Colella V, Tarallo VD, Latrofa M. S, Brianti E, Trerotoli P, Decaro N, Lorusso E, Schunack B, Mirò G, Dantas-Torres F, Otranto D. A nationwide survey of Leishmania infantum infection in cats and associated risk factors in Italy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 13(7): 1–11, 2019.
- 104.Jepson RE, Syme HM, Vallance C, Elliott J. Plasma asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethyl- arginine, l-arginine, and nitrite/nitrate concentrations in cats with chronic kidney disease and hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 22(2):317-24, 2008.
- 105.Jin Y, Nagai M, Nagai Y, Nagatomo S, Kitagawa T. Heme structures of five variants of hemoglobin M probed by resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry*. 43(26):8517-27, 2004.
- 106.Jones RR, Hooper DC, Zhang L, Wolverson D, Valev VK. Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers. *Nanoscale Reserch Letters*. 12;14(1):231, 2019.
- 107.Karayiannis S, Ntais P, Messaritakis I, Tsirigotakis N, Dokianakis E, Antoniou M. Detection of Leishmania Infantum in red foxes (Vulpes vulpes) in Central Greece. *Parasitology*. 142(13):1574-8, 2015.
- 108.Karkamo V, Kaistinen A, Nareaho A, Dillard K, Vainio-Siukola K, Vidgrén G, Tuoresmäki N, Anttila M. The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 56(1):84, 2014.
- 109.Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*. 9(8):604-15, 2011.
- 110.Kedzierski Ł, Montgomery J, Curtis J, Handman E. Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis (Warsz)*. 52(2):104-12, 2004.
- 111.Kiral F, Seyrek K, Pasa S, Ertabaklar H, Unsal C. Some haematological, biochemical and electrophoretic findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Revue De Medecine Veterinair*. 155.4: 226-229, 2004.
- 112.Kloss S, Kampe B, Sachse S, Rösch P, Straube E, Pfister W, Kiehntopf M, Popp J. Culture independent Raman spectroscopic identification of urinary

- tract infection pathogens: a proof of principle study. *Analytical Chemistry journal*. 85(20):9610-6, 2013.
113. Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*/chagasi. *Veterinary Pathology*. 51(2): 527-538, 2014.
 114. Lalkhen AG, McCluskey A. Clinical tests: sensitivity and specificity. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*. 8(6), 221-223, 2008.
 115. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in microbiology*. (5):210-4, 2003.
 116. Latrofa MS, Iatta R, Dantas-Torres F, Annoscia G, Gabrielli S, Pombi M, Gradoni L, Otranto D. Detection of *Leishmania infantum* DNA in phlebotomine sand flies from an area where canine leishmaniosis is endemic in southern Italy. *Veterinary Parasitology*. 253:39-42, 2018.
 117. Lestinova T, Rohousova I, Sima M, de Oliveira CI, Volf P. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. *PLoS neglected tropical diseases*. 11(7):e0005600, 2017.
 118. Levy E, Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Polizopoulou ZS, Psychogios V, Koutinas AF. Nasal and oral masses in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*. 35(1):115-8, 2006.
 119. Lin D, Feng S, Pan J, Chen Y, Lin J, Chen G, Xie S, Zeng H, Chen R. Colorectal cancer detection by gold nano-particle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis. *Optics Express*. 19(14):13565-77, 2011.
 120. Lloyd GR, Orr LE, Christie-Brown J, McCarthy K, Rose S, Thomas M, Stone N. Discrimination between benign, primary and secondary malignancies in lymph nodes from the head and neck utilising Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Analyst*. 138(14):3900-8, 2013.
 121. Longoni SS, Sanchez-Moreno M, Lopez JE, Marin C. *Leishmania infantum* secreted iron superoxide dismutase purification and its application to the diagnosis of canine Leishmaniasis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*. 36(5):499-506, 2013.
 122. Loria AD, Dattilo V, Santoro D, Guccione J, De Luca A, Ciaramella P, Pirozzi M, Iaccino E. Expression of Serum Exosomal miRNA 122 and Lipoprotein Levels in Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*: A Preliminary Study. *Animals (Basel)*. 10(1):100, 2020.

123. Lyandres O, Shah NC, Yonzon CR, Walsh JT, Glucksberg MR, Van Duyne RP. Real-Time Glucose Sensing by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Bovine Plasma Facilitated by a Mixed Decanethiol/Mercaptohexanol Partition Layer. *Analytical chemistry journal*. 77(19): 6134–6139, 2005.
124. Lyandres O, Yuen JM, Shah NC, Van Duyne RP, Walsh JT, Glucksberg MR. Progress Toward an In Vivo Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Glucose Sensor. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 10(4): 257–265, 2008.
125. Ma K, Yuen JM, Shah NC, Walsh JT, Glucksberg MR, Van Duyne RP. In Vivo, Transcutaneous Glucose Sensing Using Surface-Enhanced Spatially Offset Raman Spectroscopy: Multiple Rats, Improved Hypoglycemic Accuracy, Low Incident Power, and Continuous Monitoring for Greater than 17 Days. *Analytical chemistry journal*. 83(23): 9146–9152, 2011.
126. Majumder S, Dey R, Bhattacharjee S, Rub A, Gupta G, Bhattacharyya Majumdar S, Saha B, Majumdar S. Leishmania-induced biphasic ceramide generation in macrophages is crucial for uptake and survival of the parasite. *The Journal of infectious diseases*. 205(10):1607-16, 2012.
127. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1988;82(4):566-7, 1988.
128. Mancianti F, Sozzi S. Isolation of Leishmania from a newborn puppy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 89(4):402, 1995.
129. Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 5(9):1315-6, 2010.
130. Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P, Gravino AE. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasite & Vectors*. 8:289, 2015.
131. Manna L, Paciello O, Morte RD, Gravino AE. Detection of Leishmania parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasite & Vectors*. 5:216, 2012.
132. Manna L., Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Caracappa S, Gravino AE. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. 142(3-4):271-80, 2006.
133. Marcondes M, Day MJ. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Reserch Veterinary Science*. 123:261-272, 2019.

134. Maroli M, Bigliocchi F, Khoury C. I. Sandflies in Italy: observations on their distribution and methods for control. *Parassitologia*. 36(3):251-64, 1994.
135. Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, Paltrinieri S, Roura X, Zini E, Zatelli A. Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 236(11):1200-6, 2010.
136. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L. 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(2):256-64, 2008.
137. Maroli M., Khoury C. Leishmaniasis vectors in Italy. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale*. 3(3-4): 69-75, 1998.
138. Marquez M, Pedregosa JR, Lopez J, Marco-Salazar P, Fondevila D, Pumarola M. Leishmania amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 25(1):142-6, 2013.
139. Marro M, Taubes A, Abernathy A, Balint S, Moreno B, Sanchez-Dalmau B, Martínez-Lapiscina EH, Amat-Roldan I, Petrov D, Villoslada P. Dynamic molecular monitoring of retina inflammation by in vivo Raman spectroscopy coupled with multivariate analysis. *Journal of biophotonics*. 7(9):724-34, 2014.
140. Maxfield L, Crane JS. Leishmaniasis. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, PMID: 30285351, 2021.
141. McLaughlin G, Doty KC, Lednev IK. Raman spectroscopy of blood for species identification. *Analytical chemistry*. 86(23):11628-33, 2014.
142. McManus LL, Boyd AR, Burke GA, Meenan BJ. Raman spectroscopy of primary bovine aortic endothelial cells: a comparison of single cell and cell cluster analysis *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 22(8):1923-30, 2011.
143. Meyer T, Bergner N, Bielecki C, Krafft C, Akimov D, Romeike BF, Reichart R, Kalff R, Dietzek B, Popp J. Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis. *Journal of Biomedical Optics*. 16(2):021113, 2011.
144. Mhadhbi M, Sassi A. Infection of the equine population by Leishmania parasites. *Equine Veterinary Journal*. 52(1):28-33, 2020.
145. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania. *The Journal of experimental medicine*. 201(5):747-54, 2005.

- 146.Miró G, Gálvez R, Fraile C, Descalzo MA, Molina R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasite & Vectors*. 4:52, 2011.
- 147.Miró G, Petersen C, Cardoso L, Bourdeau P, Baneth G, Solano-Gallego L, Pennisi MG, Ferrer L, Oliva G. Novel areas for prevention and control of canine leishmaniosis. *trends in parasitology*. 33(9):718-730, 2017.
- 148.Morosetti G, Toson M, Trevisiol K, Idrizi I, Natale A, Lucchese L, Michelutti A, Ceschi P, Lorenzi G, Piffer C, Fiorentino E, Bongiorno G, Gradoni L. Canine leishmaniosis in the Italian northeastern Alps: A survey to assess serological prevalence in dogs and distribution of phlebotomine sand flies in the Autonomous Province of Bolzano-South Tyrol, Italy. *Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports*. 21:100432, 2020.
- 149.Motz JT, Fitzmaurice M, Miller A, Gandhi SJ, Haka AS, Galindo LH, Dasari RR, Kramer JR, Feld MS. In vivo Raman spectral pathology of human atherosclerosis and vulnerable plaque. *Journal of Biomedical Optics*. 11(2):021003, 2006.
- 150.Munstermann, LE. Care, maintenance, and experimental infection of phlebotomine sand flies. Ch. 56. In Marquardt WC, Black WC, Freier J, Hagedorn H, Hemingway J, Higgs S, James AA, Kondratieff B, Moore CG. (Eds.), *Biology of disease vectors* (2nd ed., pp. 757e762). San Diego, CA: Elsevier Science (USA). 2004.
- 151.Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Rakitin A, Aguiar J, Relford R. Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 29(4):1036-44, 2015.
- 152.Naucke TJ, Amelung S, Lorentz S. First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasite & Vectors*. 9(1):256, 2016.
- 153.Neng J, Li Y, Driscoll AJ, Wilson WC, Johnson PA. Detection of multiple pathogens in serum using silica-encapsulated nanotags in a surface-enhanced Raman scattering-based immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66(22): 5707-5712, 2018.
- 154.Nicolato Rde C, de Abreu RT, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Reis LE, Carvalho Md, Carneiro CM, Giunchetti RC, Bouillet LE, Lemos DS, Coura-Vital W, Reis AB. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS ONE*. 8(12):e82947, 2013.
- 155.Nicolle C, Comte C. Origine canine du kala-azar. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 1: 299–301, 1908.

156. Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*. 45(1-2):33-47, 1992.
157. Noli C, Auxilia S. Treatment of Old World visceral leishmaniasis: A systematic review. *Veterinary Dermatology*. 16(4):213-32, 2005.
158. Nylen S, Maurya R, Eidsmo L, Manandhar KD, Sundar S, Sacks D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine*. 204(4):805-17, 2007.
159. Oliva G, Roura X, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 236(11):1192-8, 2010.
160. Oliva G, Roura X, Crotti A, Zini E, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A. Leishmaniosi canina: Linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte II: Approccio terapeutico. *Veterinaria*. 22, 9–20, 2008.
161. Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(4):1318-22, 2006.
162. Olsztńska-Janus S, Gasiór-Glagowska M, Szyborska-Malek K, Kamorawska M, Witkiewicz W, Pezovicz C, Szotek S, Kobielarz M. “Spectroscopic techniques in the study of human tissue and their components. Part II: Raman Spectroscopy”. *Acta of bioengineering and biomechanics*, vol. 14, (4), pp.121-133, 2012.
163. Orkoula MG, Kontoyannis CG. Raman spectroscopy for the study of biological organism (biogenic materials and biological tissues): A valuable analytical tool. *Spectroscopy Europe*. 26 16-19, 2014.
164. Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in Parasitology*. 29(7):339-45, 2013.
165. Otranto D, Paradies P, De Caprariis D, Stanneck D, Testini G, Grimm F, Deplazes P, Capelli G. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in endemic area. *Clinical and Vaccine Immunology*. 16(3):337-43, 2009.
166. Owen CA, Selvakumaran J, Notingher I, Jell G, Hench LL, Stevens MM. In vitro toxicology evaluation of pharmaceuticals using Raman microspectroscopy. *Journal of Cellular Biochemistry*. 99(1):178-86, 2006.

167. Owens SD, Oakley DA, Maryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan T.J, Newton A, Steurer F, Schnatz P, Giger U. Transmission of visceral leishmaniasis to anemic dogs through blood transfusions from infected foxhounds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 219(8):1076-83, 2001.
168. Pallaoro A, Mirsafavi RY, Culp WTN, Braun GB, Meinhart CD, Moskovits M. Screening for canine transitional cell carcinoma (TCC) by SERS-based quantitative urine cytology. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*. 14(4): 1279-1287, 2018.
169. 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. Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 236(11):1184-91, 2010.
170. Paltrinieri S, Gradoni L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis *Veterinary Clinical Pathology*. 45(4):552-578, 2016.
171. Parachalil DR, Commerford D, Bonnier F, Chourpa I, McIntyre J, Byrne HJ. Raman spectroscopy as a potential tool for label free therapeutic drug monitoring in human serum: the case of busulfan and methotrexate. *The Analyst*. 144(17): 5207-5214, 2019.
172. Paradies P, Sasanelli M, de Caprariis D, Testini G, Traversa D, Lia RP, Dantas-Torres F, Otranto D. Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal*. 186(3):370-3, 2010.
173. Parpaglia ML, Vercelli A, Cocco R, Zobba R, Manunta ML. Nodular lesions of the tongue in canine leishmaniosis. *Journal of veterinary medicine A, Physiology, pathology, clinical medicine*. 54(8):414-417, 2007.
174. Pence I, Mahadevan-Jansen A. Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy. *Chemical Society reviews*. 45(7):1958-79, 2016.
175. Pennisi MG, Persichetti MF. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?. *Veterinary parasitology*, 251:131-137, 2018.
176. Picado A, Singh SP, Rijal S, Sundar S, Ostin B, Chappuis F, Uranw S, Gidwani K, Khanal B, Rai M, Paudel IS, Das ML, Kumar R, Srivastava P, Dujardin JC, Vanlerberghe V, Andersen EW, Davies CR, Boelaert M. Longlasting insecticidal nets for prevention of *Leishmania donovani* infection in India and Nepal: paired cluster randomised trial. *BMJ (Clinical research ed.)*. 341:c6760, 2010.
177. Pilotto S, Pacheco MT, Silveira L Jr, Villaverde AB, Zângaro RA. Analysis of near-infrared Raman spectroscopy as a new technique for a transcutaneous

- non-invasive diagnosis of blood components. *Lasers Medicine Science*. 6(1):2-9, 2001.
178. Pinto-Martinez AK, Rodriguez-Durán J, Serrano-Martin X, Hernandez-Rodriguez V, Benaim G. Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisomes function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca²⁺ channel. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 62(1):e01614-17, 2018.
 179. Planellas M, Roura X, Lloret A. Presence of renal disease in dogs with patent leishmaniasis. *Parassitologia* 51, 65-68, 2009.
 180. Poglayen G, Marangon S, Manca MG, Capelli G, Dalla Pozza M, Casati D, Vantini E, Bresa G, Passarini G. A new Outbreak of Canine Leishmaniosis in the North-East of Italy. *Acta Parasitologica Turcica*. 21 (Suppl. 1): 143, 1997.
 181. Pozio E, Gradoni L, Gramiccia M. La leishmaniosis canine en Italia de 1910 a 1983. *Annales de parasitologie humaine et comparee*. 60(5):543-53, 1985.
 182. Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dereure J, Lanotte G, Dedet JP. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *Journal of clinical microbiology*. 42(9):4077-82, 2004.
 183. Qu JY, Wilson BC, Suria D. Concentration Measurements of Multiple Analytes in Human Sera by Near-Infrared Laser Raman Spectroscopy. *Application*. 38(25): 5491–5498, 1999.
 184. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 136(14):1915-34, 2009.
 185. Raman C, Krishnan KA. New Type of Secondary Radiation. *Nature*. 121, 501–502, 1928.
 186. Rashid N, Nawaz H, Poon KW, Bonnier F, Bakhiet S, Martin C, O'Leary JJ, Byrne HJ, Lyng FM. Raman microspectroscopy for the early detection of pre-malignant changes in cervical tissue. *Experimental and Molecular Pathology*. 97(3):554-64, 2014.
 187. Regli IB, Passelli K, Hurrell BP, Tacchini-Cottier F. Survival Mechanisms Used by Some *Leishmania* Species to Escape Neutrophil Killing. *Frontiers in Immunology*. 8: 1558, 2017.
 188. Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary parasitology*. 227:98-114, 2016.
 189. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status

- and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clinical and experimental immunology*. 146(2):303-11, 2006.
190. Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jiménez M, Muncunill J, Sedeño M, Mascaró M, Udina M, Gállego M, Carrió J, Forteza A, Portús M. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion*. 48(7):1383-9, 2008.
 191. Riera C, Valladares JE. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitology Today*. 12(10): 412, 1996.
 192. Rinia HA, Bonn M, Vartiainen EM, Schaffer CB, Müller M. Spectroscopic analysis of the oxygenation state of hemoglobin using coherent anti-Stokes Raman scattering. *Journal of Biomedical Optics*. 11(5):050502, 2006.
 193. Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today*. 16(7):292-7, 2000.
 194. Rohleder D, Kiefer W, Petrich W. Quantitative Analysis of Serum and Serum Ultrafiltrate by Means of Raman Spectroscopy. *Analyst*. 129(10): 906–911, 2004.
 195. Rohleder D, Kocherscheidt G, Gerber K, Kiefer W, Kohler W, Mocks J, Petrich W. Comparison of mid-infrared and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of serum. *Journal of Biomedical Optics*. 10(3): 031108, 2005.
 196. Rösch P, Harz M, Schmitt M, Peschke KD, Ronneberger O, Burkhardt H, Motzkus HW, Lankers M, Hofer S, Thiele H, Popp J. Chemotaxonomic identification of single bacteria by micro-Raman spectroscopy: application to clean-room-relevant biological contaminations. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 71(3):1626-37, 2005.
 197. Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gradomi L, Gramiccia M, Maroli M, Mortarino M, Pietrobelli M, Ruggiero M. Leishmap: the network for monitoring the spread of canine leishmaniasis and its vectors in northern Italy. Proc. *Third World Congress on Leishmaniasis*, Palermo-Terrasini, p. 201. 10–15 April, 2005.
 198. Rossi L, Ferroglio E, Guiso P, Ferrasi P, Pancaldi P. Segnalazione di un focolaio di leishmaniosi canina sulla collina torinese. *Medicina Veterinaria Preventiva*. 20: 20, 1999.
 199. Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology*. 91(4): 970-972, 2005.
 200. Rub A, Arish M, Husain SA, Ahmed N, Akhter Y. Host-lipidome as a potential target of protozoan parasites. *Microbes and infection*. 15(10-11):649-60, 2013.
 201. Russell A. *The Natural History of Aleppo, and Parts Adjacent*. London: A. Millar; p. 262–6, 1756.

202. Ryzhikova E, Ralbovsky NM, Halámková L, Celmins D, Malone P, Molho E, Quinn J, Zimmerman EA, Lednev IK. Multivariate Statistical Analysis of Surface Enhanced Raman Spectra of Human Serum for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Applied Sciences*. 9(16):3256, 2019.
203. Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M, Ferrer L. 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 area. *Preventive Veterinary Medicine*. 115 (1–2): 56–63, 2014.
204. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews. Immunology*. 2(11):845-58, 2002.
205. Salant H, Nachum-Biala Y, Feinmesser B, Perelmutter M, Baneth G. Early onset of clinical leishmaniosis in a litter of pups with evidence of in utero transmission. *Parasites and Vectors journal*. 15;14(1):326, 2021.
206. Santos M, Marcos R, Assuncao M, Matos AJ. Polyarthrititis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Veterinary Parasitology*. 141(3-4):340-4, 2006.
207. Sbrana S, Marchetti V, Mancianti F, Guidi G, Bennett D. Retrospective study of 14 cases of canine arthritis secondary to *Leishmania* infection. *Journal of Small Animal Practice*. 55(6):309-13, 2014.
208. Šćepanović OR, Fitzmaurice M, Miller A, Kong CR, Volynskaya Z, Dasari RR, Kramer JR, Feld MS. Multimodal spectroscopy detects features of vulnerable atherosclerotic plaque. *Journal of Biomedical Optics*. 16(1):011009, 2011.
209. Secombe AK, Ready PD, Huddleston LM. A catalogue of Old World Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Occasional Papers on Systematic Entomology*. 8: 1–57, 1993.
210. Segarra S, Miró G, Montoya A, Pardo-Marín L, Boqué N, Ferrer L, Cerón J. Randomized, allopurinol-controlled trial of the effects of dietary nucleotides and active hexose correlated compound in the treatment of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 239:50-56, 2017.
211. Segarra S, Miró G, Montoya A, Pardo-Marín L, Teichenné J, Ferrer L, Cerón JJ. Prevention of disease progression in *Leishmania infantum*-infected dogs with dietary nucleotides and active hexose correlated compound. *Parasite & Vectors*. 11(1):103, 2018.
212. Shao J, Lin M, Li Y, Li X, Liu J, Liang J, Yao H. In Vivo Blood Glucose Quantification Using Raman Spectroscopy. *PLoS One*. 7(10): e48127, 2012.

213. Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 160(1-2): 55-59, 2009.
214. Slama D, Haouas N, Remadi L, Mezhouh H, Babba H, Chaker E. First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasite & Vectors*. 7: 51; 2014.
215. Smekal A. Zur Quantentheorie der Dispersion. *Naturwissenschaften*. 11,873–875, 1923.
216. Solano-Gallego L, Cardoso L, Pennisi MG, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, Miro G, Ferrer L, Baneth G. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. *Trends in Parasitology*. 33(9):706-717, 2017.
217. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 165(1-2):1-18, 2009.
218. Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. The LG. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasite & Vectors*. 4: 86, 2011.
219. Solano-Gallego L, Montserrat-Sangra S, Ordeix L, Martinez-Orellana P. *Leishmania infantum*- specific production of IFN-gamma and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. *Parasite & Vectors*. 9(1):317, 2016.
220. Solano-Gallego L, Rossi L, Scroccaro AM, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 5: 98, 2012.
221. Spada E, Canzi I, Baggiani L, Perego R, Vitale F, Migliazzo A, Proverbio D. Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 45:53-8, 2016.
222. Spada E, Proverbio D, Migliazzo A, Della Pepa A, Perego R, Bagnagatti De Giorgi G. Serological and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* Infection in Stray Cats in a Nonendemic Area in Northern Italy. *ISRN parasitology*. 2013:916376, 2013.
223. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors journal*. 10(1):82, 2017.
224. Stockham SL, Scott MA. Urinary system. In: Stockham SL, Scott MA, eds. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2nd ed. Ames, IA: Blackwell Publishing; 415–494, 2008.

225. Stosch R, Henrion A, Schiel D, Güttler B. Surface-enhanced Raman scattering based approach for quantitative determination of creatinine in human serum. *Analytical chemistry journal*. 77(22):7386-92, 2005.
226. Suzuki EM, Buzzing P. Applications of Raman spectroscopy in forensic science. I: Principles, comparison to infrared spectroscopy, and instrumentation. *Forensic Science Review*. 30(2):111-135, 2018.
227. Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L, Ruiz de Gopegui R. Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *Journal of Small Animal Practice*. 49(7):325-8, 2008.
228. Tadesse LF, Safir F, Ho CS, Hasbach X, Khuri-Yakub BP, Jeffrey SS, Saleh AAE, Dionne J. Toward rapid infectious disease diagnosis with advances in surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Chemical Physics*. 152(24):240902, 2020.
229. Telleria EL, Martins-da-Silva A, Tempone AJ, Traub-Csekö YM. Leishmania, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*. 145(10):1336-1353, 2018.
230. Terrazas C, Oghumu S, Varikuti S, Martinez-Saucedo D, Beverley SM, Satoskar AR. Uncovering Leishmania-macrophage interplay using imaging flow cytometry. *Journal of Immunology Methods*. 423:93-8, 2015.
231. Terrazzano G, Cortese L, Piantedosi D, Zappacosta S, Di Loria A, Santoro D, Ruggiero G, Ciaramella P. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary immunology and immunopathology*. 110(3-4):331-7, 2006.
232. Toepp AJ, Bennett C, Scott B, Senesac R, Oleson JJ, Petersen CA. Maternal *Leishmania infantum* infection status has significant impact on leishmaniasis in offspring. *PLoS neglected tropical diseases*. 13(2): e0007058, 2019a.
233. Toepp AJ, Monteiro GRG, Coutinho JFV, Lima AL, Larson M, Wilson G, Grinnage-Pulley T, Bennett C, Mahachi K, Anderson B, Ozanne MV, Anderson M, Fowler H, Parrish M, Willardson K, Saucier J, Tyrell P, Palmer Z, Buch J, Chandrashekar R, Brown GD, Oleson JJ, Jeronimo SMB, Petersen CA. Comorbid infections induce progression of visceral leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 12(1):54. 2019b.
234. Toepp AJ, Petersen CA. The balancing act: Immunology of leishmaniasis. *Research in veterinary science*. 130:19-25, 2020.
235. Toepp AJ, Schaut RG, Scott BD, Mathur D, Berens AJ, Petersen CA. *Leishmania* incidence and prevalence in U.S. hunting hounds maintained via vertical transmission. *Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports*. 10:75-81, 2017.

236. Torres M, Pastor J, Roura X, Tabar MD, Espada Y, Font A, Balasch J, Planellas M. Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*. 57(6): 299-304, 2016.
237. Twining W. Observations on diseases of the spleen particularly on the vascular engorgement of that organ common in Bengal. *translational medicine physician society of bengal*. 3:351–412, 1827.
238. Vailati MCF, Camacho AA, Schwartz DS, Lourenço MLG, Tahahira RK, Franco SRVS. características eletrocardiográficas de cães da raça boxer. *Veterinária e Zootecnia*, v.16, n.4 p.698-707, dez. 2009.
239. Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Record*. 146(24):698-70, 2000.
240. Vida B, Toepp A, Schaut RG, Esch KJ, Juelsgaard R, Shimak RM, Petersen CA. Immunologic progression of canine leishmaniosis following vertical transmission in United States dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 169: 34–38, 2016.
241. Viegas C, Requicha J, Albuquerque C, Sargo T, Machado J, Dias I, Pires MA, Campino L, Cardoso L. Tongue nodules in canine leishmaniosis a case report. *Parasite & Vectors*. 5:120, 2012.
242. Viñuelas J, García-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Mirón C, Carcelén J, Alonso C, Nieto CG. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. 101(1):23-7, 2001.
243. Von Hendy-Willson VE, Pressler BM. An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *Veterinary Journal*. 188(2):156-65, 2011.
244. Walker SE, Allen SH, Hoffman RW, McMurray RW. Review. Prolactin: a stimulator of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 4 (1): 3–9, 1995.
245. Walters LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 40(2):196-206, 1993.
246. Wang Q, Grozdanic SD, Harper MM, Hamouche K, Hamouche N, Kecova H, Lazic T, Hernandez-Merino E, Yu C. Detection and characterization of glaucoma-like canine retinal tissues using Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 18(6): 067008, 2013.
247. Wang Q, Grozdanic SD, Harper MM, Hamouche N, Kecova H, Lazic T, Yu C. Exploring Raman spectroscopy for the evaluation of glaucomatous retinal changes. *Journal of Biomedical Optics*. 16(10): 107006, 2011.
248. Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Nadaes NR, Nascimento MT, Roatt BM, Reis AB, Viana KF, Giunchetti RC, Saraiva EM. Neutrophil properties in healthy

and *Leishmania infantum* naturally infected dogs. *Scientific Report*. 9(1):6247, 2019.

249. WHO (World Health Organization). Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, WHO technical report series 949. Geneva, Switzerland. 22–26 March 2010.
250. Wood BR, McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy in malaria research. *Expert Review Proteomics*. 3(5):525-44, 2006.
251. Wright I, Moral-Gant JM. Possible vertical transmission of *Leishmania* in a dog. *Veterinary Record*. 187(1):35, 2020.
252. Wylie CE, Carbonell-Antoñanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, Solano-Gallego L. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: vaccinations. *Preventive Veterinary Medicine*. 117(1):7-18, 2014.
253. Yasur-Landau D, Jaffe CL, David L, Baneth G. Allopurinol resistance in *Leishmania infantum* from dogs with disease relapse. *PLoS neglected tropical diseases*. 10 (1): e0004341, 2016.
254. Zheng Q, Li J, Yang L, Zheng B, Wang J, Lv N, Luo J, Martin FL, Liu D, He J. Raman spectroscopy as a potential diagnostic tool to analyse biochemical alterations in lung cancer. *The Analyst*. 145(2): 385-392, 2020.
255. Zhou G, Yu D, Li S, Yang D. Surface enhanced Raman spectroscopy of leucine and isoleucine. *Acta Chemica Sinica*, 65(7): 640, 2007.
256. Zink AR, Spigelman M, Schraut B, Greenblatt CL, Nerlich AG, Donoghue HD. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper nubia. *Emerging Infectious Diseases journal*. 12(10):1616-7, 2006.

SITI INTERNET

1. www.who.int WHO (World Health Organization). Leishmaniasis. Epidemiological situation. 2017.
2. www.bwtek.com /raman-theory-of-raman scattering
3. www.leishvet.org
4. www.iris-kidney.com. International Renal Interest Society; 2019.
5. www.esccap.org ESCCAP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites) Vector-borne Disease, 2016.
6. www.salute.gov.it OMS, 1990.