

Leishmaniosi canina: il ruolo degli immunocomplessi circolanti nel determinismo della malattia



La leishmaniosi canina (CanL) si presenta tipicamente come una malattia ad andamento cronico, le cui manifestazioni cliniche e la gravità delle stesse rappresentano l'espressione di meccanismi patogenetici esito della complessa interazione tra il parassita e le difese immunitarie dell'ospite. Diversi studi sono stati improntati alla ricerca di biomarker che possano essere utili sia ai fini diagnostici che prognostici nei cani affetti da leishmaniosi. Tra essi, è stato preso in considerazione il dosaggio dei livelli di immunocomplessi circolanti (CICs) e la loro possibile correlazione con la progressione e la gravità dell'infezione. In corso di infezione da *Leishmania infantum* nel cane, la produzione di alti livelli di anticorpi, associata alla presenza di grandi quantità di antigeni del parassita, possono determinare la formazione ed il continuo aumento di CICs e la loro conseguente deposizione a livello delle pareti vasali di organi target causando un'ampia varietà di espressioni cliniche. Il dosaggio dei CICs presenta numerosi aspetti positivi che rendono tale misura un potenziale utile biomarker applicabile in ambito diagnostico, prognostico ed anche nello studio di nuove strategie vaccinali e immunoterapiche.

Valentina Foglia
Manzillo,
Med Vet, PhD,
Professore Associato
in Clinica Medica
Veterinaria

Manuela Gizzarelli,
Med Vet, PhD,
Ricercatore
in Clinica Medica
Veterinaria

LA RISPOSTA IMMUNITARIA DEL CANE IN CORSO DI LEISHMANIOSI

Nell'ampio panorama delle malattie infettive del cane, di sicuro la leishmaniosi canina ricopre un ruolo rilevante, sia per la sua distribuzione globale, che per gli aspetti zoonotici ed infine per le caratteristiche patogenetiche tipiche di tale malattia che la rendono estremamente polimorfa e variabile dal punto di vista clinico. La leishmaniosi canina si presenta come una malattia ad andamento cronico, ma sia le manifestazioni cliniche, che le alterazioni clinico-patologiche e la conseguente gravità dei soggetti affetti, possono ricoprire un ampio spettro di quadri, che sono l'espressione di meccanismi patogenetici

esito della complessa interazione tra il parassita e le difese immunitarie dell'ospite¹. Tra l'altro, gli aspetti clinico-diagnostici, soprattutto in dati contesti epidemiologici, possono essere ulteriormente complicati dalla possibile coesistenza di altre malattie infettive o parassitarie trasmesse da vettori (ehrlichiosi, anaplasmosi, micoplasmosi, babesiosi, hepatozoonosi e dirofilariosi). L'esito dell'infezione in corso di leishmaniosi canina è strettamente connesso al tipo di risposta immunitaria innescata dalla presentazione dell'antigene parassitario ai linfociti T-helper da parte di macrofagi tissutali, cellule di Langerhans e cellule dendritiche. Le difese immunitarie umorali e cellulo-mediate vengono attivate ma è la tipologia di risposta immunitaria e il profilo di interleuchine prodotte che condizionano la resistenza o sensibilità all'infezione².

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali,
Napoli

*Corresponding Author (valentina.foglia@unina.it)

Ricevuto: 29/11/2021 - Accettato: 08/02/2022

Lo sviluppo dell'immunità protettiva dipende dalla risposta della sottopopolazione di linfociti T helper attivata, se Th1 o Th2: la resistenza alla malattia è mediata da un tipo di risposta immunitaria cellulo-mediata (Th1), con aumento di linfociti citotossici CD8+ nel sangue periferico. I cani con malattia conclamata mostrano inizialmente un tipo di risposta simile a quella dei cani resistenti, che viene inibita nel tempo, con una risposta di tipo misto (Th1/Th2), a prevalenza Th2³. Questo tipo di risposta immunitaria, accompagnata dalla produzione di elevati livelli di anticorpi, è il principale fattore chiave nella patogenesi della malattia, data la correlazione diretta tra sintomatologia, titoli anticorpali e aumento della carica parassitaria nei tessuti.

Immunocomplessi circolanti (CICs): cosa sono e che cosa provocano?

I CICs sono aggregati macromolecolari formati dall'unione di un antigene con il corrispondente e specifico anticorpo formato dall'organismo in conseguenza di una reazione immunitaria (ipersensibilità di tipo III) che induce una risposta infiammatoria sistemica o locale. I CICs possono formarsi nei tessuti dove è avvenuta la reazione immunitaria oppure in circolo. In questo caso, quando i CICs formati sono di piccole dimensioni e solubili, vengono eliminati rapidamente dall'organismo attraverso i reni; se invece sono di grandi dimensioni e poco solubili, vengono fagocitati dalle cellule istiocitarie. In condizioni normali, la formazione di CICs facilita l'eliminazione dell'antigene, grazie alla neutralizzazione dei suoi effetti nocivi, come nel caso delle tossine, e grazie all'intervento delle cellule fagocitarie che rimuovono gli stessi CICs.

In particolari condizioni, i CICs possono persistere a lungo in circolo, venir trasportati in diverse sedi dove si depositano (per es. nei glomeruli renali o nelle pareti dei vasi sanguigni) e provocare danni anche gravi interagendo con vari fattori cellulari o umorali ed in particolare attivando il sistema del complemento.

Nel caso di CICs poco solubili che si depositano nei tessuti vicini al sito di entrata dell'antigene, si sviluppa una reazione localizzata. Se, invece, gli immunocomplessi sono solubili e si formano nel sangue, essi si depositano in zone filtro, prevalentemente situate sulla membrana basale del glomerulo renale, sulla membrana sinoviale delle articolazioni, sui plessi corioidei del cervello e sulle pareti dei vasi. In ogni caso, si sviluppa un danno tissutale a livello del sito di deposito, mediato da piccole molecole

solubili derivate dall'attivazione del complemento.

Malattia da immunocomplessi locale (Reazione di Arthus)

La forma locale della reazione di ipersensibilità di tipo III è la reazione di Arthus, che non è altro che una vasculite acuta da immunocomplessi. Per l'eccesso di anticorpi si formano enormi immunocomplessi che precipitano in sito nel giro di qualche ora e provocano effetti infiammatori come necrosi fibrinoidi vasali, emorragie locali, trombosi e ischemie. È presente un infiltrato di polimorfonucleati⁴.

Malattia da immunocomplessi sistemica

Gli anticorpi indotti dall'antigene si legano alle IgG ed IgM e si fissano al complemento, così come le IgA (seppure non per via diretta); le IgE, invece, si legano ai basofili inducendoli a liberare il fattore attivante piastrine (PAF) e istamina che inducono l'aumento della permeabilità vascolare formando spazi tra le cellule dell'endotelio e permettendo ai complessi di penetrare la parete vascolare, oppure legandosi alle cellule infiammatorie attraverso i recettori per i "frammenti del complemento" (Fc e C3b e inducendo la liberazione di mediatori vasoattivi e di citochine che provocano co-

RIQUADRO 1

Fattori che partecipano alla reazione di ipersensibilità sistemica:

- Vengono prodotti *fattori chemiotattici* (frammenti C5 e C5c67 del complemento) che indirizzano in loco i leucociti, i polimorfonucleati e i monociti;
- Viene rilasciata l'*opsonina C3b*, che favorisce la fagocitosi;
- Vengono rilasciate le *anafilatossine C3a e C5a*, che provocano degranolazione dei mastociti, aumentano la permeabilità vascolare e causano la contrazione della muscolatura liscia vasale;
- Si forma il *complesso di attacco alla membrana (C5-9)* che causa danni alle membrane cellulari e successiva citolisi;
- Vengono rilasciate *sostanze pre-infiammatorie* come prostaglandine e peptidi vasodilatatori;
- Vengono rilasciati *enzimi lisosomiali*, anche in seguito alla citolisi, che hanno azione litica (come le proteasi);
- I PAF prodotti dai basofili inizialmente attivati dalle IgE, provocano aggregazione piastrinica;
- Viene attivato il *fattore di Hageman (CF-XII)*, che rappresenta il capostipite della via intrinseca della produzione di tutti gli altri fattori della cascata coagulativa.

La gravità della malattia dipende dal tipo di risposta immunitaria: la produzione di anticorpi e di CICs che si depositano nelle pareti vasali di diversi organi creano danni tissutali gravi.

munque l'aumento della permeabilità vascolare. Queste interazioni danno il via alla cascata complementare che comprende molteplici figure proteiche, con i ruoli più disparati, innescando diversi effetti locali e sistemici.

Gli effetti sistemici si traducono nella formazione di microtrombi, nell'amplificazione dell'effetto infiammatorio e nell'intensa essudazione di neutrofili. Nello specifico si hanno vasculiti (come la vasculite necrotizzante acuta), glomerulonefriti, artriti, e così via, a seconda del sito in cui avviene la deposizione dei CICs.

I CICs NELLA LEISHMANIOSI CANINA

Il ruolo patologico dei CICs è stato evidenziato in un gran numero di condizioni come malattie autoimmuni, allergie e neoplasie^{5,6,7,8,9,10,11}. È altresì stato definito il ruolo degli stessi anche in malattie infettive causate da differenti patogeni come virus, batteri, protozoi ed elminti^{12,13,14,15}.

Sia in modelli animali sia umani, sono stati effettuati diversi studi inerenti i livelli di CICs^{16,17,18}. Ad esempio, alti livelli di CICs sono stati ritrovati in circa il 30% dei sieri di pazienti umani affetti da leishmaniosi viscerale, ma anche in quelli affetti da leishmaniosi cutanea ed infine la loro persistenza è stata rilevata persino nei sieri di soggetti clinicamente guariti^{19,20}. Diversi studi hanno suggerito che le complicanze sviluppate dai pazienti umani affetti da leishmaniosi, e di conseguenza la gravità del quadro clinico degli stessi, possano essere correlate alla deposizione degli immunocomplessi, in particolar modo per quanto riguarda l'insorgenza e lo sviluppo di glomerulonefrite^{19,21,22,23}. Per quanto riguarda il cane affetto da leishmaniosi, è accertato il ruolo patogenetico degli immunocomplessi in corso di infezione, il loro ruolo nello sviluppo di alcuni quadri sintomatologici e ne è anche stata ipotizzata una correlazione con la gravità del quadro clinico.

I danni causati dalla deposizione dei CICs sono: vasculiti, glomerulonefriti, uveiti, miositi, poliartriti.

Nei cani che sviluppano una non controllata risposta umorale, la continua ed elevata produzione di anticorpi, associata alla presenza di grandi quantità di antigeni di *Leishmania*, determina la formazione ed il continuo incremento di CICs, composti da aggregati di proteine del protozoo, anticorpi delle classi IgG ed IgM e frazioni del sistema complemento²⁴.

I macrofagi attivati dagli immunocomplessi inibiscono la biosintesi di IL-12 e quindi la produzione di INF-gamma, citochina chiave per la risposta immunitaria cellu-

lo-mediata, con conseguente produzione di alti livelli di interleuchina 10 (IL-10)^{16,19}, che riduce la capacità dei macrofagi di uccidere il parassita e di eliminare i CICs. Come già riportato in precedenza, le manifestazioni più gravi della leishmaniosi canina quali glomerulonefriti, vasculiti, uveiti, miositi e poliartriti sono diretta espressione della produzione e precipitazione dei CICs nelle pareti vasali di questi tessuti. Quanto descritto in precedenza è una chiara dimostrazione della necessità di quantificare sempre nel tempo il livello di anticorpi prodotto dal cane in corso di leishmaniosi, come un marker specifico della risposta immunitaria prodotta e direttamente correlata alla capacità o meno di controllare l'infezione¹⁹.

IMMUNOCOMPLESSI CIRCOLANTI, PATOGENESI E SEVERITÀ DEI QUADRI CLINICI IN CORSO DI LEISHMANIOSI CANINA

Nei cani affetti da forme cliniche di leishmaniosi, il quadro sintomatologico risulta estremamente polimorfo. In particolar modo, l'ampia variabilità clinica è imputabile ai cambiamenti che possono avvenire a carico della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata. Sia la marcata risposta umorale, che esita nella deposizione degli immunocomplessi in vari organi target, sia l'intensa infiammazione granulomatosa, sono espressione di una scompensata risposta immunitaria nei confronti del parassita e spiegano l'ampio range di manifestazioni riscontrabili^{1,25}.

In corso di CanL, il quadro istopatologico che si sviluppa a carico dei diversi organi e tessuti è l'esito di due fenomeni principali:

- L'infezione pio-granulomatosa, caratterizzata dall'infiltrazione di macrofagi, istiociti, linfociti e plasmacellule a carico soprattutto di linfonodi, milza, midollo, fegato, intestino, ossa e mucose¹;
- La deposizione di CICs, responsabile di vasculite con attivazione della cascata del complemento, e l'insorgenza di lesioni a carico di diversi distretti viscerali, della cute, dei muscoli, degli occhi e dei reni²⁶.

In alcuni casi, entrambi i meccanismi sono contemporaneamente responsabili delle lesioni in alcuni tessuti come cute, muscoli, membrane sinoviali e occhi^{1,27,28,29,30}.

Nei cani malati, i segni clinici più frequenti possono essere di tipo sistemico (anoressia/disoressia, letargia, perdita di peso, epistassi, linfoadenomegalia, splenomegalia, intolleranza all'esercizio fisico, atrofia dei muscoli temporali, poliuria/polidipsia, vomito e/o diarrea, cachessia) oppure interessare esclusivamente alcuni distretti (lesioni cutanee o oculari, onicografosi e zoppia). Inoltre, le diverse manifestazioni cliniche possono apparire sia singolarmente che in associazione, dando esito a qua-



Figura 1 - Lesioni ulcerative.



Figura 2 - Lesioni ulcerative.

dri clinici a volte molto complessi¹.

Le lesioni cutanee sono tra quelle maggiormente frequenti in corso di leishmaniosi canina, e spesso anche il principale motivo per cui il paziente è portato a visita dal proprietario³¹. I segni più comuni sono alopecia simmetrica non pruriginosa, dermatite ulcerativa (Figure 1 e 2), e/o desquamativa e/o nodulare, presenza di pustole sterili, dermatite papulare e onicogrifosi^{2,31} (Figura 3). Ogni lesione è il risultato dell'inflammatione granulomatosa o piogranulomatosa ma anche, sebbene in minor misura, della deposizione di CICs a livello dei distretti cutanei. I segni clinici oculari sono frequenti e possono interessare qualsiasi distretto e presentarsi singolarmente o in associazione. I più comuni sono: blefarite, congiuntivite, miosite dei muscoli extra oculari e cellulite orbitale ("lunettes periorbitali" o "occhiali"), cheratite, cheratocongiuntivite, uveite, episclerite, oltre a complicanze come glaucoma e panoftalmite². Anche in questo caso i meccanismi patogenetici alla base sono duplici: da una parte l'inflammatione granulomatosa locale, dall'altra la deposizione degli immunocomplessi in tale distretto^{32,33,34}.

Il danno renale da immunocomplessi è considerato un fattore prognostico negativo.

La zoppia intermittente, l'atrofia muscolare e la riluttanza all'esercizio fisico, segni di frequente riscontro, possono essere imputati sia alle miopatie conseguenti alla de-

posizione degli immunocomplessi a livello delle miofibre in associazione all'inflammatione locale generata dalla presenza di amastigoti di *Leishmania*, ma anche a lesioni a carico delle articolazioni¹. In corso di leishmaniosi, le artropatie principali sono rappresentate da forme di mono o poliartriti non erosive, conseguenti sia all'inflammatione linfoplasmocitica/granulomatosa secondaria alla presenza di amastigoti nelle membrane sinoviali, che all'inflammatione di tipo neutrofilico che è conseguente alla deposizione degli immunocomplessi¹. Sicuramente, tra le complicanze dovute alla produzione e deposizione dei CICs in corso di leishmaniosi canina, quella più nota e maggiormente studiata è la nefropatia. Alti livelli sierici di CiCs sono stati associati allo squilibrio della funzione renale³⁵. La deposizione degli immunocomplessi a livello delle strutture glomerulari e/o nella matrice mesangiale si rende responsabile di glomerulonefriti mesangio-proliferative e membrano-proliferative. Le lesioni tubulo-interstiziali di norma appaiono in maniera secondaria alla patologia glomerulare,

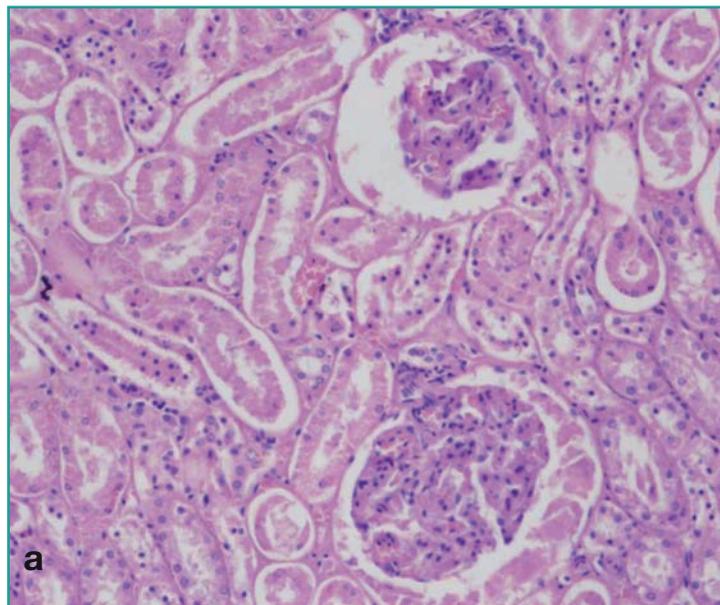


Figura 3 - Onicogrifosi associata a grave quadro ulcerativo.

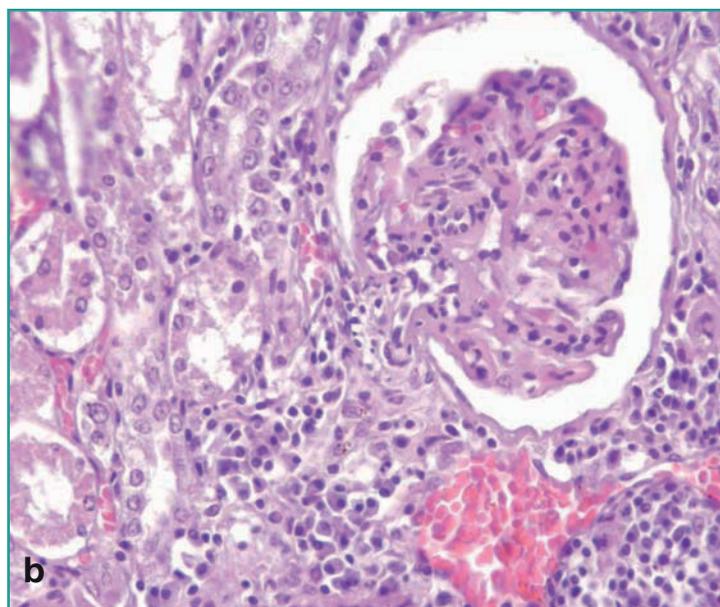
così come all'infiammazione mediata dagli immunocomplessi e la fibrosi dell'interstizio renale^{1,21,36,37}. Il danno renale correlato alla deposizione dei CICs svolge un ruolo fondamentale nella prognosi della malattia ed è stato infatti adottato come un criterio importante per la stadiazione clinica della malattia nel cane^{19,38,39,40,41}. L'animale può mostrare dalla sola proteinuria fino alla sindrome uremica, risultato dello stadio finale della malattia, caratterizzato da insufficienza renale, principale causa di morte negli animali malati (Figura 4a e b).

Oltre agli aspetti strettamente patogenetici inerenti la deposizione degli immunocomplessi circolanti a carico dei diversi distretti, negli ultimi anni un interesse è stato sviluppato nella possibilità di correlare i livelli dei CiCs alla gravità dei quadri clinici sviluppati^{16,19}.

Recentemente è stato messo a punto un protocollo per l'isolamento e la quantificazione dei livelli sierici di CICs in cani con infezione naturale da *Leishmania infantum*²⁴. La metodica permette di dosare i livelli sierici di Polyethylene glycol (PEG)-precipitated CICs, specifici nell'infezione da *L. infantum*, basandosi su una metodica colorimetrica ed esprimendoli quindi in base alla loro densità ottica. Uno studio specifico²⁴ ha permesso di dosare i livelli sierici di CICs in 60 cani che mostravano diversi stadi di infezione e malattia e ha rilevato una correlazione statisticamente significativa tra i livelli di immunocomplessi dosati e lo stadio patologico dei soggetti esaminati (Tabella 1). Lo stesso studio ha altresì evidenziato come le maggiori dimensioni dei CICs possano essere correlate ad un peggioramento delle condizioni cliniche dei pazienti, come riportato anche per altre patologie^{42,43,44} e che tali dimensioni possano influenzare il sito di deposito e di conseguenza la tipologia di danno glomerulare elicitato, come già documentato in studi precedenti^{21,37,45}.



a



b

Figura 4 - (a e b) Glomerulonefrite cronica e nefrite interstiziale.

a: In entrambi i glomeruli si evidenzia un ispessimento della membrana basale ed un aumento dello spazio di Bowman con deposito di materiale granulare eosinofilo. Le anse capillari appaiono coartate in un glomerulo (in alto) mentre nel glomerulo in basso si osserva un ispessimento del mesangio. Si evidenzia inoltre una moderata infiltrazione di piccoli linfociti (reperto necroscopico, Ematossilina-Eosina, 20X).

b: Si evidenzia un ispessimento della membrana basale ed un aumento dello spazio di Bowman all'interno del quale le anse capillari appaiono ispessite per il deposito di materiale amorfo nel mesangio. Nell'interstizio si osserva una marcata e diffusa infiltrazione di linfociti e plasmacellule (reperto necroscopico, Ematossilina-Eosina, 40X).

I livelli sierici dei CICs sembrano essere correlati alla gravità ed alla progressione della malattia.

Tabella 1 - Classificazione della CanL associata allo stadio clinico (LeishVet), ai livelli di CICs, ai segni clinici ed alla prognosi²⁴.

Stadio clinico	Sierologia	CIC	Segni clinici	Prognosi
Non infetto	Negativa	Assenti	Assenti	Buona
Infetto asintomatico	Negativa	Assenti	Assenti	Buona
Stadio I (malattia lieve)	Negativa o titoli anticorpali bassi	Livelli bassi	Lievi (aumento di volume dei linfonodi e dermatite papulare)	Buona/riservata
Stadio II (malattia moderata)	Titoli anticorpali bassi/alti	Livelli bassi/medi	Segni dello stadio I più: lesioni cutanee diffuse o simmetriche (dermatite esfoliativa, onicogriposi, ulcere); anoressia, perdita di peso, febbre ed epistassi	Riservata/buona
Stadio III (malattia grave)	Titoli anticorpali medio/alti	Livelli Medi/alti	Segni dello stadio I e II a cui si associano segni clinici correlati alla deposizione dei CIC: vasculiti, artriti, uveiti e glomerulonefriti	Riservata/inausta
Stadio IV (malattia molto grave)	Titoli anticorpali medio/alti	Livelli medio/alti	Segni clinici stadio III e tromboembolismo polmonare o sindrome nefrosica, insufficienza renale cronica (stadio terminale)	Infausta

I CICs hanno un possibile ruolo sia diagnostico che prognostico durante la malattia e quindi potrebbero rappresentare un utile e semplice biomarker.

Uno studio più recente²⁶ ha invece valutato i livelli di CICs sia in cani esposti all'infezione naturale che in quelli sottoposti ad infezione sperimentale. I soggetti esaminati erano stati classificati in differenti gruppi in base alle condizioni cliniche, i titoli anticorpali IFAT, e all'esito della nested (n)-PCR midollare. Lo studio ha evidenziato una correlazione diretta tra i valori di IFAT e i livelli di CICs nella progressione dell'infezione da *Leishmania infantum* con livelli bassi degli stessi nei soggetti n-PCR positivi, clinicamente sani, con bassi o negativi livelli di anticorpi. Lo studio ha anche permesso di rilevare dei livelli di immunocomplessi più alti nei soggetti esposti ad infezione naturale, rispetto a quelli infettati sperimentalmente.

CICs COME BIOMARKER PER MONITORARE LA PROGRESSIONE DELLA LEISHMANIOSI CANINA

L'evoluzione dell'infezione da *Leishmania infantum* è caratterizzata da un'estrema complessità tra una serie di fattori che vedono centrali il ruolo del parassita, il vettore e il sistema immunitario del-

l'ospite definitivo. Le possibili interazioni danno luogo a quadri patogenetici, esiti clinici e implicazioni prognostiche variabili da soggetto a soggetto. Di conseguenza, molti studi sono stati incentrati sulla ricerca e sulla valutazione di possibili biomarker utili ai fini sia diagnostici che prognostici. In questo panorama, anche il dosaggio dei livelli di immunocomplessi circolanti sembrerebbe avere dei riscontri pratici utili, in particolare per valutare la progressione dell'infezione verso stadi conclamati di malattia^{16,46}. Diverse metodiche sono state messe a punto per l'isolamento e la quantificazione dei CICs sia in corso di infezione sperimentale⁴⁷ che naturale^{24,26}. Questi studi hanno effettivamente dimostrato una correlazione positiva tra i livelli di CICs e lo stadio clinico della malattia, suggerendo il potenziale ruolo diagnostico e prognostico della misurazione dei livelli dei CIC in corso di CanL. Sebbene sia ancora necessaria un'ulteriore validazione su un numero più ampio di soggetti a diversi stadi di malattia, il dosaggio dei CICs presenta numerosi aspetti positivi che lo rendono un potenziale biomarker diagnostico e prognostico.

La misurazione dei livelli sierici di CICs può essere un valido supporto per la valutazione dell'efficacia di vaccini o immunoterapie.

RIQUADRO 2

Caratteristiche positive dei CICs come biomarker:

- La misurazione dei livelli di CICs richiede metodi che non invasive
- Le alte concentrazioni di CICs e la contemporanea presenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche suggestive sono associate alla malattia clinica
- Il loro aumento nel tempo può avere un ruolo prognostico negativo
- La loro quantificazione può divenire uno strumento utile per monitorare l'efficacia del trattamento terapeutico e del vaccino¹⁹.

A questi interessanti aspetti si aggiunge anche il potenziale ruolo dei CICs come biomarker per la valutazione dell'efficacia delle metodiche impiegate per la profilassi della leishmaniosi. Studi recenti hanno infatti valutato la possibile efficacia dell'immunizzazione con antigeni "interni" di *Leishmania*^{19,48,49,50} nello stimolare una potente risposta immunitaria in grado di ridurre la formazione dei CICs. Questo aspetto è in linea con quanto ipotizzato da precedenti ricerche in cui la virulenza del parassita era attribuita non solo agli antigeni di superficie e prodotti dal parassita, ma anche a proteine intracellulari considerate "patoantigeni"⁵¹. L'immunizzazione ottenuta con antigeni interni stimolerebbe quindi una risposta immune rapida e forte, con la conseguente produzione di anticorpi specifici che eliminerebbero gli antigeni intracellulari del parassita, riducendo in maniera

significativa la produzione di CICs in corso di leishmaniosi.

Ad oggi, alcuni dati ottenuti in corso di infezione sperimentale sembrerebbero dimostrare che la protezione offerta dall'unico prodotto vaccinale commercializzato in Europa (Letifend[®]) sia dovuta anche alla sua capacità di ridurre i livelli dei CICs²⁴. Lo studio in oggetto ha infatti misurato i livelli di CICs sia in cani sottoposti ad infezione sperimentale e vaccinati con Letifend[®] che in cani naturalmente infetti e non vaccinati. I CICs sono stati misurati con metodica ELISA e colorimetrica in diversi tempi del follow up; i loro livelli sono sempre stati più bassi nel gruppo vaccinato e sono stati correlati ad una carica parassitaria inferiore. Anche la composizione proteica dei CICs nel gruppo vaccinato si è dimostrata diversa ed in particolare caratterizzata da un significativo incremento delle proteine del sistema complemento, la cui attivazione comporterebbe la massiva distruzione dei parassiti extracellulari.

Nonostante sia ancora necessaria un'ulteriore validazione del ruolo dei CICs in corso di infezione naturale, i dati ottenuti fino ad oggi aprono promettenti scenari di ricerca soprattutto sul potenziale impiego degli stessi nello studio di nuove strategie vaccinali ed immunoterapiche. Riguardo a quest'ultimo aspetto, allo stato attuale non sono stati messi a punto protocolli specifici per limitare la formazione dei CICs in corso di Leishmaniosi canina. La precocità della diagnosi e la somministrazione tempestiva del trattamento terapeutico specifico anti-leishmania sono sicuramente la migliore arma che ha il medico veterinario per contrastare e bloccare la formazione ed il deposito dei CICs in corso di leishmaniosi.

PUNTI CHIAVE

- La formazione ed il deposito di CICs svolgono un ruolo centrale nella patogenesi della Leishmaniosi canina, causando quadri clinici gravi, come in particolare la glomerulonefrite da immunocomplessi. Il danno renale ha infatti un valore prognostico negativo in corso di malattia.
- Lo studio di biomarker di semplice misurazione è oggetto di diversi recenti studi. I CICs sono stati proposti come potenziali biomarker sia a scopo diagnostico che prognostico, in quanto il loro dosaggio sembra essere correlato con la gravità e la progressione dell'infezione.
- È necessario approfondire gli studi clinici in corso di infezione naturale nel cane. Il dosaggio dei CICs potrebbe avere un ruolo importante sia come marker precoce di malattia, sia per la valutazione dell'efficacia dei vaccini e di trattamenti immunoterapici.

Role of Circulating Immune Complexes in the Pathogenesis of Canine Leishmaniasis

Summary

Canine leishmaniasis (CanL) is a chronic disease. Clinical manifestations and the severity of the same are expressions of pathogenetic mechanisms result from the complex interaction between the parasite and the host's immune response. Several studies have been based on the search for biomarkers that can be useful both for diagnostic and prognostic purposes in dogs affected by leishmaniasis. Among them, the dosage of the levels of circulating immune complexes (CICs) and their possible relationship with the progression and severity of the infection was considered. During infection with Leishmania infantum in dogs, the production of high levels of antibody, associated with the large quantities of antigens of the parasite, can determine the production and continuous increase of CICs and their consequent deposition in the vessel walls of different organs causing a large variety of clinical expressions. The dosage of CICs offers several positive aspects that make this measure a potential useful biomarker applicable in the diagnostic, prognostic field and also in the study of new vaccination and immunotherapeutic strategies.

BIBLIOGRAFIA

- Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*/chagasi. *Veterinary Pathology* 51: 527-538, 2014.
- Traversa D, Venco L. Leishmaniosi. In: *Parassitologia clinica del cane e del gatto*. Milano: Point Vetérinaire Italie, 2018, pp.61-76.
- Carrillo E, Moreno J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128:67-70, 2009.
- Giorgio Poli. *Microbiologia ed Immunologia Veterinaria*. III ed. Ed. EDRA., Immunopatologia, pag 527-547, 2017.
- Abrass CK, Nies KM, Louie JS, *et al*. Correlation and predictive accuracy of circulating immune complexes with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology* 23: 273-282,1980.
- Bernstein KA, Kahl LE, Balow JE, *et al*. Serologic markers of lupus nephritis in patients: Use of a tissue-based ELISA and evidence for immunopathogenic heterogeneity. *Clinical & Experimental Immunology* 98: 60-65,1994.
- Weissmann G. Rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus as immune complex diseases. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases*. 67:251-253, 2009.
- Parveen S, Taneja N, Bathi RJ, *et al*. Evaluation of circulating immune complexes and serum immunoglobulins in oral cancer patients - A follow up study. *Indian Journal of Dental Research* 21:10-15, 2010.
- Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, *et al*. Detection of immunecomplex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *Journal of Clinical Microbiology* 41:4154-4159, 2003.
- Miles SA, Balden E, Magpantay L, *et al*. Rapid serologic testing with immune-complex-dissociated HIV p24 antigen for early detection of HIV infection in neonates. *Southern California Pediatric AIDS Consortium. The New England Journal of Medicine* 328: 297-302, 1993.
- Sengupta K, Ghosh PK, Ganguly S, *et al*. Characterization of entamoeba histolytica antigens in circulating immune complexes in sera of patients with amoebiasis. *Journal of Health, Population and Nutrition* 20: 215-222, 2002.
- Senbagavalli P, Hilda JN, Ramanathan VD, *et al*. Immune complexes isolated from patients with pulmonary tuberculosis modulate the activation and function of normal granulocytes. *Clinical and Vaccine Immunology* 19:1965-1971, 2012.
- AL-Fakhar SA. Circulating immune complexes in relation to polymorphonuclear leucocytes in patients infected with toxoplasmosis. *Biomedical and Pharmacology Journal* 10, 2017.
- Harrus S, Day MJ, Waner T, *et al*. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology* 83: 343-349, 2001.
- Matsumura K, Kazuta Y, Endo R, *et al*. Detection of circulating immune complexes in the sera of dogs infected with *Dirofilaria immitis*, by Clq-binding enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Helminthology* 60: 239-243, 1986.
- Miles SA, Conrad SM, Alves RG, *et al*. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *Journal of Experimental Medicine* 201:747-754, 2005.
- Elshafie AI, Ahlin E, Mathsson L, *et al*. Circulating immune complexes (IC) and IC-induced levels of GM-CSF are increased in sudanese patients with acute visceral *Leishmania donovani* infection undergoing sodium stibogluconate treatment: Implications for disease pathogenesis. *Journal of Immunology* 178: 5383-5389, 2007.
- Requena JM, Soto M, Doria MD, *et al*. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 76: 269-281, 2000.
- Cacheiro-Llaguno C, Parody N, Escutia MR, *et al*. Role of Circulating Immune Complexes in the Pathogenesis of Canine Leishmaniasis: New Players in Vaccine Development. *Microorganisms* 9: 712, 2021.
- Al-Fakhar SA, Ali WM, Obaid KY, *et al*. Association of circulating immune complexes in the development of visceral leishmaniasis. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 13: 3284-3288, 2020.
- Costa FA, Goto H, Saldanha LC, *et al*. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology* 40: 677-684, 2003.
- Clementi A, Battaglia G, Floris M, *et al*. Renal involvement in leishmaniasis: A review of the literature. *NDT Plus* 4:147-152, 2011.
- Lopez R, Lucena R, Novales M, *et al*. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 43: 469-474, 1996.
- Parody N, Cacheiro-Llaguno C, Osuna C, *et al*. Circulating immune complexes levels correlate with the progression of canine leishmaniasis in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 274:108921, 2019.
- Baneth G, Solano-Gallego L. *Leishmaniasis*. In: Greene CE, ed. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th ed. St Louis, MO: Elsevier/Saunders 2012, pp. 734-749.
- Gizzarelli M, Fiorentino E, Ben Fayala NEH, *et al*. Assessment of circulating immune complexes during natural and experimental canine leishmaniasis. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 273, 2020.
- Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, *et al*. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104:227-237, 2005.
- Pena MT, Naranjo C, Klauss G, *et al*. Histopathological features of ocular leishmaniasis in the dog. *Journal of Comparative Pathology* 138: 32-39, 2008.
- Soubasis N, Theodorou K, Kasabalis D, *et al*. Prevalence of arthritis in naturally infected leishmanial dogs: a prospective study. In: *Proceedings of the BSAVA Congress; 2013; Birmingham, England*. p 586.
- Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, *et al*. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*).

- tum). Veterinary Record 146: 698-703, 2000.
31. Saridomichelakis MN, Koutinas AF. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). Veterinary Dermatology 25: 61-71, 2014.
 32. Roze M. Manifestacions oculaires de la Leishmaniose canine. Recueil de Medecine Veterinaire 162:19-26, 1986.
 33. Ferrer L. Leishmaniasis. In: Kirk RW, Bonagura JD, eds. Current Veterinary Therapy XI. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1992, pp. 266-270.
 34. Garcia-Alonso M, Blanco A, Reina D, et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. Parasite Immunology 18:617-623, 1996.
 35. Lopez R, Lucena R, Novales M, et al. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. Zentralblatt fur Veterinarmedizin B 43: 469-474, 1996.
 36. Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, et al. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). Journal of Veterinary Internal Medicine 20: 228-233, 2006.
 37. Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, et al. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. American Journal of Veterinary Research 64:558-561, 2003.
 38. Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasites & Vectors 4: 86, 2011.
 39. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 236:1184-1191, 2010.
 40. Pierantozzi M, Roura X, Paltrinieri S, et al. Variation of proteinuria in dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate and allopurinol: A retrospective study. Journal of the American Animal Hospital Association 49: 231-236, 2013.
 41. Proverbio D, Spada E, Bagnagatti de Giorgi G, et al. Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. BioMed Research International 412808, 2014.
 42. Korolevskaia LB, Shmagel KV, Shmagel NG, et al. The size and composition of circulating immune complexes during HIV infection. Doklady Biochemistry and Biophysics 457:134-136, 2014.
 43. Mannik M. Physicochemical and functional relationships of immune complexes. Journal of Investigative Dermatology 74:333-338, 1980.
 44. Nangaku M, Couser WG. Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury. Clinical and Experimental Nephrology 9: 183-191, 2005.
 45. Poli A, Abramo F, Mancianti F, et al. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. Nephron 57:444-452, 1991.
 46. Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. Veterinary Parasitology 45:33-47, 1992.
 47. Cacheiro-Llaguno C, Parody N, Renshaw-Calderon A, et al. Vaccination with LetiFend® reduces circulating immune complexes in dogs experimentally infected with *L. infantum*. Vaccine 38: 890-896, 2020.
 48. Baharia RK, Tandon R, Sahasrabudhe AA, et al. Nucleosomal histone proteins of *L. donovani*: A combination of recombinant H2A, H2B, H3 and H4 proteins were highly immunogenic and offered optimum prophylactic efficacy against *Leishmania* challenge in hamsters. PLOS ONE 9:e97911, 2014.
 49. Iborra S, Soto M, Carrion J, et al. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniosis. Vaccine 22: 3865-3876, 2004.
 50. Iborra S, Soto M, Carrion J, et al. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. Infection and Immunity 71:6562-6572, 2003.
 51. Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. *Leishmania* model for microbial virulence: The relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. Acta Tropica 85:375-390, 2003.



ITINERARI DIDATTICI
IN PARTENZA NEL 2022





7° ITINERARIO DIDATTICO DI ANESTESIA

SCADENZA ISCRIZIONI:
9 MAGGIO 2022



4° ITINERARIO DIDATTICO DI ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA

SCADENZA ISCRIZIONI:
1 GIUGNO 2022



4° ITINERARIO DIDATTICO DI MEDICINA FELINA

SCADENZA ISCRIZIONI:
29 AGOSTO 2022



4° ITINERARIO DIDATTICO DI NUTRIZIONE

SCADENZA ISCRIZIONI:
12 SETTEMBRE 2022



3° ITINERARIO DIDATTICO DI FISIATRIA

SCADENZA ISCRIZIONI:
23 SETTEMBRE 2022



1° ITINERARIO DIDATTICO DI TOMOGRAFIA ASSIALE COMPUTERIZZATA (TAC)

SCADENZA ISCRIZIONI:
7 OTTOBRE 2022



8° ITINERARIO DIDATTICO DI MEDICINA INTERNA

SCADENZA ISCRIZIONI:
21 OTTOBRE 2022