

## Evoluzione dei protocolli terapeutici in corso di leishmaniosi canina

G. Oliva, V. Foglia Manzillo, A. Pagano

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie (Sezione di Clinica Medica), Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, via F. Delpino, 1 80137 Napoli.

**Abstract** [Canine leishmaniasis: evolution of the chemotherapeutic protocols]. Dogs are the domestic reservoir for *Leishmania infantum* (syn.: *L. chagasi*), the parasite causing zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) in both the Old and New Worlds. In foci of canine leishmaniasis (CanL), symptomatic disease occurs in less than 50% of infected dogs, and is characterized by chronic evolution of viscerocutaneous signs. Among strategies recommended to control ZVL, detection and drug treatment of infected dogs are usually employed in the endemic countries of southern Europe. However, the conventional antileishmanial drugs successfully used in human therapy, such as pentavalent antimonials, amphotericin B, pentamidine or miltefosine, have low efficacy in the treatment of CanL. In dogs, these drugs induce only temporary remission of clinical signs, do not prevent occurrence of relapses, and often cause severe side effects. Leishmaniotic dogs may be classified into 4 groups: 1) Asymptomatic resistant dogs ("contacted dogs"), 2) Asymptomatic dogs (preclinical), 3) Dogs with minimal signs of leishmaniasis (oligosymptomatic dogs? Chronic form of leishmaniasis?), 4) Dogs suffering from different forms of clinical leishmaniasis (symptomatic dogs). The dog's immunological status and the associated clinical signs may influence the efficacy of antileishmanial drugs. Subjects belonging to groups 2, 3 and 4 should be always treated, in order to reduce their parasite load. Parameters that must be considered before starting the antileishmanial treatment are hemogram, renal and hepatic functions, electrophoretic protein pattern, antileishmania antibody titres, and bone marrow and lymph node parasite load. The most common antileishmanial drugs currently used in Italy to treat CanL are pentavalent antimonials (meglumine antimoniate) and allopurinol, alone or in combination. Other used drugs are aminosidine (syn.: paromomycin), pentamidine, metronidazole and spyramicin. Each drug regimen has different duration, from a few weeks (aminosidine), to a few months (meglumine antimoniate) or several months (allopurinol). One of the most recent drug used in human VL is liposomal amphotericin B (AmBisome - L-AMB), a powerful antileishmanial drug in both experimental murine models and in VL patients. In Italy, L-AMB is now considered the drug of choice for the treatment of human cases. However, in HIV co-infected patients high doses of L-AMB are ineffective in obtaining a radical cure. In dogs, L-AMB treatment rapidly leads to clinical recovery but is ineffective to eliminate the parasites. Drugs containing amphotericin B should not be used in veterinary practice in order to avoid selection of parasites resistant to the drug, as it already occurred for the pentavalent antimonials. Currently, there is not a standard protocol for CanL treatment in Italy, as there is an extreme variability of proposed dosages. Clinical studies on immunotherapeutics and new antileishmanial drugs, such as miltefosine and its derivatives, are in progress.

Il cane rappresenta il serbatoio principale nella diffusione della leishmaniosi viscerale umana sostenuta da *Leishmania infantum* nel vecchio mondo e da *Leishmania chagasi* nel nuovo mondo. Il controllo della malattia nell'animale, quindi, insieme alla lotta ai vettori, rappresenta il mezzo più valido per salvaguardare la salute umana, oltre naturalmente a preservare quella degli animali colpiti. Un profondo motivo di riflessione è dato dal fatto che, com'è ampiamente noto, le persone immunocompetenti che si ammalano, guariscono completamente in seguito a terapia specifica, a differenza di quanto accade nel cane nel quale le recidive sono un evento costante, indipendentemente dalla sostanza utilizzata. Il notevole polimorfismo dei quadri clinici osservabile nel cane rende ancora più complesso l'approccio terapeutico alla malattia e, in alcuni casi, lo rende più dannoso che utile. Il corteo sintomatologico del cane leishmaniotico riflette le svariate combinazioni che possono realizzarsi in virtù della

diversa virulenza dei ceppi di leishmania in causa e delle condizioni immunitarie dell'animale, queste ultime probabilmente predeterminate da fattori genetici, del tutto sconosciuti in questa specie animale. La sintomatologia della leishmaniosi canina è alquanto polimorfa; nella maggior parte dei casi la patologia assume un andamento subacuto o cronico. Raramente è possibile osservare una fase acuta con la comparsa di febbre (quando presente è di tipo remittente o intermittente), a differenza di quanto riportato nell'uomo. Le forme cliniche possono essere asintomatiche, paucisintomatiche e plurisintomatiche. La storia clinica può riferire un lento ma progressivo dimagrimento, una lieve o marcata disoressia, astenia e facile affaticamento, accompagnate da lesioni cutanee per lo più di tipo furfuraceo, anche se non sono rare lesioni quali ulcere e noduli. Le lesioni cutanee sono spesso localizzate al naso e alla testa, sedi preferenziali per la puntura dei flebotomi. Segni ugualmente frequenti sono l'aumento di volume



dei linfonodi e della milza, l'anemia, la comparsa di epistassi e le lesioni oculari; una complicazione molto temuta e purtroppo frequente è l'insufficienza renale. In base alle caratteristiche cliniche, al tipo di risposta immunitaria e alla carica parassitaria, possono essere distinte diverse classi di cani leishmaniotici; è utile sottolineare, comunque, che, nella pratica clinica, tale classificazione risulta spesso arbitraria e non così precisa come quella di seguito riportata per fini didattici. Uno degli obiettivi che il clinico deve porsi prima di decidere se e come trattare un cane leishmaniotico è quello di inquadrare in maniera quanto più possibile corretta quale sia la categoria cui l'animale appartiene e, soprattutto, cercare di prevedere quale possa essere l'evoluzione clinica che l'infezione/malattia subirà in quell'animale. E' utile ricordare, infatti, che al momento della diagnosi, il 50-60% dei cani "positivi" risulta asintomatico. Nelle zone endemiche, dove è presente il flebotomo vettore, questo tipo di previsione è resa ancora più complicata per il fatto che ancora non si conosce in quale modo il ricevere nuove e continue cariche infettanti nelle stagioni di trasmissione possa influire sullo stato immunitario e sul decorso clinico di questi soggetti.

Con discreta approssimazione, i cani leishmaniotici possono essere classificati nei seguenti gruppi:

#### 1) Cani asintomatici resistenti ("in contact" dog)

- Nessun segno clinico riferibile ad infezione leishmanica;
- Nessuna alterazione ematologica o ematobiochimica;
- Assenza di parassiti all'esame microscopico dell' ago aspirato linfonodale e midollare;
- Titoli anticorpali (IFAT) stabilmente molto bassi (1:40-1:80) con possibilità di negativizzazione temporanea o definitiva;
- Positività dell'esame colturale (agar-sangue) di materiale linfonodale e/o midollare variabile nel tempo, con possibilità di negativizzazione temporanea o definitiva;
- Positività dell' esame PCR su sangue periferico, linfonodo e midollo variabile nel tempo, con possibilità di negativizzazione temporanea o definitiva;
- Livelli elevati di IFN- $\gamma$  e IL12 (risposta immunitaria di tipo Th1);
- Skin test alla leishmanina (DHT) positivo.

Per definire un cane "leishmaniotico asintomatico resistente" ("contacted") è necessario che almeno uno dei test parassitologici, sierologici o biologici risulti positivo, in un arco di tempo variabile di almeno alcuni mesi. Di solito questi cani persistono in questa condizione per tutta la vita. Allo stato attuale non vi sono evidenze scientifiche che dimostrino la necessità di trattamento farmacologico di questa categoria di cani.

#### 2) Cani asintomatici (preclinici)

- Nessun segno clinico riferibile ad infezione leishmanica;

- Nessuna alterazione ematologica o ematobiochimica;
- Presenza di parassiti all'esame microscopico dell' ago aspirato linfonodale e midollare;
- Titoli anticorpali (IFAT) stabilmente persistenti, bassi o elevati (> 1:80);
- Positività dell'esame colturale (agar-sangue) di materiale linfonodale e/o midollare;
- Positività dell' esame PCR su sangue periferico, linfonodo e midollo;
- Risposta immunitaria variabile, di tipo Th1 o, più frequentemente, Th2 con elevati livelli di IL-4 e IL-10;
- Skin test alla leishmanina (DHT) negativo/positivo.

La grande maggioranza di questi animali va incontro a forme di malattia più o meno conclamate durante il corso della vita. Anche in assenza di segni clinici, questi cani devono essere sottoposti a terapia farmacologica poiché costituiscono un serbatoio attivo del parassita.

#### 3) Cani con segni minimi di malattia persistenti nel tempo (oligosintomatici? Forme croniche?)

- Una/piccole lesione/i, di solito dermatologica/e, persistente/i nel tempo, riferibile a leishmaniosi (piccoli noduli, ulcerazioni);
- Nessuna alterazione ematologica o ematobiochimica;
- Assenza di parassiti all'esame microscopico dell' ago aspirato linfonodale e midollare;
- Titoli anticorpali (IFAT) stabilmente bassi (1:40-1:80), a volte variabili nel tempo;
- Esame colturale (agar-sangue) di materiale linfonodale e/o midollare negativo;
- Esame colturale (agar-sangue) di materiale ottenuto dalle lesioni positivo;
- Esame PCR su sangue periferico, linfonodo e midollo variabile nel tempo, di solito negativo;
- Risposta immunitaria variabile, di tipo Th1 o Th2;
- Skin test alla leishmanina (DHT) negativo/positivo.

Questi cani, probabilmente, dovrebbero essere trattati con terapia farmacologica.

#### 4) Cani sintomatici

- Vari segni clinici riferibili a leishmaniosi;
- Alterazione del profilo ematologico ed ematobiochimico;
- Presenza di numerosi parassiti all'esame microscopico dell' ago aspirato linfonodale e midollare;
- Titoli anticorpali (IFAT) di solito stabilmente elevati ( $\geq$  1:160);
- Positività dell'esame colturale (agar-sangue) di materiale linfonodale e/o midollare;
- Positività dell'esame PCR da numerosi materiali organici (sangue, cute, linfonodo, midollo);
- Livelli elevati di IL4 e IL12 (risposta immunitaria di tipo Th2);
- Skin test alla leishmanina (DHT) negativo.

Questi cani devono essere sottoposti a trattamento terapeutico.



Lo stato immunitario del soggetto e la gravità dei segni clinici ad esso associati possono influenzare l'efficacia della terapia. In ogni caso, prima di intraprendere qualsiasi tipo di protocollo terapeutico devono essere determinati alcuni parametri, quali l'emogramma, la funzionalità epatica e renale, il profilo elettroforetico delle proteine plasmatiche, il titolo anticorpale antileishmania e la carica parassitaria, ottenuta dalla lettura di strisci linfonodali e/o midollari. La corretta valutazione dell'andamento di tali parametri nel tempo consente anche di capire, nella maggior parte dei casi, quando interrompere o riprendere il trattamento e di emettere una corretta prognosi. Il protocollo terapeutico più frequentemente utilizzato in Italia è quello che prevede l'impiego dell'antimoniato di N-metilglucamina in combinazione con l'allopurinolo con dosaggi e tempi di somministrazione molto variabili. I due farmaci precedentemente citati spesso vengono utilizzati in monoterapia. Farmaci considerati "alternativi" sono l'amfotericina B (classica o liposomizzata), l'amminosidina e la pentamidina, poco utilizzati in virtù della loro marcata tossicità renale (amfotericina B classica, amminosidina) ed epatica (pentamidina). La forma liposomizzata dell'amfotericina B (AmBisome) è di gran lunga meno tossica di quella non veicolata; attualmente rappresenta il farmaco più utilizzato in Italia nelle persone affette da leishmaniosi, con percentuali di guarigione pressoché totali negli immunocompetenti. Nel cane questo farmaco ha fornito ottimi risultati in termini di guarigione clinica ma, analogamente agli altri, non consente l'eliminazione definitiva del parassita. Per questo motivo, sembra utile richiamare l'attenzione dei colleghi sulla necessità di non utilizzare prodotti a base di amfotericina B nel cane, per evitare la possibile comparsa di ceppi di *Leishmania* chemioresistenti. Alcuni chemioantibiotici, quali la spiramicina e l'enrofloxacin, da soli od associati a metronidazolo, non sembrano fornire risultati tali da giustificare l'utilizzazione in monoterapia; ancora in fase di sperimentazione sono la miltefosine e i suoi derivati e l'atovaquone. Vengono riportati di seguito alcuni esempi di schemi terapeutici desunti dalla letteratura:

#### Allopurinolo

- 20-30 mg/kg BID, per os, per 1 mese in associazione con glucantim (75 mg/kg BID, s.c.), poi per 12 mesi come terapia di mantenimento (Ferrer *et al.*, 1995);
- 15 mg/kg BID, per os, per 1 mese in associazione con glucantim (100 mg/kg SID, s.c.), poi per 8 mesi come terapia di mantenimento (Denerolle *et al.*, 1999);
- 10 mg/kg SID, per os, per 2-24 mesi (Cavaliero *et al.*, 1999).

#### Antimoniato di N-metilglucamina

- 50 mg/kg, BID, s.c., per 2 mesi o fino a normalizzazione del quadro clinico (Oliva *et al.*, 1998);
- 75-100 mg/kg, BID, s.c., per 2-3 mesi (Pennisi, 2000).

#### Amminosidina

- 5,25-10,5 mg/kg, SID o BID, s.c., per 3 settimane (Persechino *et al.*, 1995);
- 10 mg/kg, SID, s.c., per 4 settimane (Poli *et al.*, 1997);

- 10,5 mg/kg, SID, s.c., per 3 settimane, in associazione con glucantim, 50 mg/kg, BID, s.c., per 1 mese (Oliva *et al.*, 1998).

#### Amfotericina B desossicolato

- 0,5-0,8 mg/kg, e.v., ogni 2-3 gg, fino a una dose totale di 8-15 mg/kg. Sospendere quando la creatinemia superi i 2,5 mg/dl (Lamothe, 2001);
- 1-2 mg/kg, e.v., 1-2 volte alla settimana, fino ad una dose cumulativa di 8-12 mg/kg, di una soluzione ottenuta mescolando 50 mg di Amfotericina (diluata in 10 ml di acqua distillata sterile) + 30 ml di Intralipid 10% (Lamothe, 2001);
- 0,2-0,3 mg/kg (1a e 2a dose), poi 0,4 mg/kg (3a - 30 dose), SID, e.v., a gg alterni (Delgado, 2000).

#### Amfotericina B microincapsulata nei liposomi (AmBisome)

- 3 mg/Kg, SID, e.v., per 5 gg consecutivi + una singola dose dopo 10 gg dall'inizio del trattamento (Oliva *et al.*, 1995).

#### Pentamidina

- 4 mg/kg, SID, i.m., a gg alterni, per 1 mese (Oliva *et al.*, 1996).

Come già accennato, nessuno di questi protocolli consente la guarigione definitiva dei cani ammalati; alcuni di essi, tuttavia, in particolare la combinazione tra l'antimoniato di N-metilglucamina (2-3 mesi) e l'allopurinolo (trattamenti protratti per più di un anno), sembrano assicurare la guarigione clinica per periodi notevolmente lunghi, specialmente quando le condizioni iniziali del cane non siano gravemente compromesse. Un nuovo filone di ricerca prevede l'impiego di sostanze immunomodulanti che, nell'animale ammalato, siano in grado di condizionare il ripristino di una risposta immunitaria di tipo Th1. Gli immunomodulanti specifici sono sostanze (in genere proteine) prodotte dallo stesso agente eziologico che hanno un evidente ruolo nello stimolare una risposta protettiva specifica in soggetti "responder". Nel campo della leishmaniosi sono stati già individuati e selezionati alcuni antigeni capaci di evocare in animali di laboratorio e anche nel cane una risposta immunitaria protettiva, o consentire la guarigione di quelli ammalati. Altre strade percorribili sono quelle che prevedono l'impiego di citochine "positive" (interferone gamma, interleuchina 12), da utilizzare a scopo profilattico o terapeutico. Diversi esperimenti vaccinali sono in corso in varie parti del mondo, sia nell'uomo che nel cane. In questo panorama così vario, ed in attesa di risultati concreti, è auspicabile che la ricerca farmacologica "classica" continui nella messa a punto di molecole dotate di attività leishmanicida, allo scopo di offrire agli animali ammalati una qualità di vita ottimale e, possibilmente, la loro guarigione parassitologica.

#### Riferimenti bibliografici

- Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P (1999). Clinical, serologic, and parasitologic follow-



- up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. J Vet Intern Med 13 (4): 330-334.
- Delgado J (2000). Atti European Cost B9, Madrid.
- Denerolle P, Bourdoiseau G (1999). Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). J Vet Intern Med Sep-Oct 13 (5): 413-415.
- Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portus M (1995) Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. Vet Rec 136 (20): 514-516.
- Lamothe J (2001). Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. J Small Anim Pract Apr; 42 (4): 170-175.
- Oliva G, Gradoni L, Ciaramella P, De Luna R, Cortese L, Orsini S, Davidson RN, Persechino A (1995). Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. J Antimicrob Chemother Dec 36 (6): 1013-1019
- Oliva G, Cortese L, Ciaramella P, De Luna R (1996). Trattamento terapeutico della leishmaniosi canina. Veterinaria 10: 115-127.
- Oliva G, Gradoni L, Cortese L, Orsini S, Ciaramella P, Scalone A, De Luna R, Persechino A (1998). Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitology 92: 165-171.
- Pennisi MG (2000). Atti Giornate Scientifiche Merial, Riccione.
- Persechino A, Oliva G, Ciaramella P, De Luna R, Cortese L (1995). Impiego dell'amminosidina nella terapia della leishmaniosi del cane. Nota II. Riv Zoot Vet 23: 36.
- Poli A, Sozzi S, Guidi G, Bandinelli P, Mancianti F (1997). Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. Vet Parasitol 71 (4): 263-271.