

LEISHMANIOSI CANINA: LINEE GUIDA SU DIAGNOSI, STADIAZIONE, TERAPIA, MONITORAGGIO E PREVENZIONE

Parte II: Approccio terapeutico

CANINE LEISHMANIASIS: GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, STAGING, THERAPY, MONITORING AND PREVENTION

Part II: Therapeutic approach

A CURA DEL GRUPPO DI STUDIO SULLA LEISHMANIOSI CANINA (G.S.L.C.)

GAETANO OLIVA¹ - XAVIER ROURA² - ALBERTO CROTTI³ - ERIC ZINI⁴ - MICHELE MAROLI⁵
MASSIMO CASTAGNARO⁶ - LUIGI GRADONI⁷ - GEORGE LUBAS⁸
SAVERIO PALTRINIERI⁹ - ANDREA ZATELLI¹⁰

¹ Prof., DVM, Ordinario di Clinica Medica Veterinaria, Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università di Napoli Federico II, Via Federico Delpino 1, Napoli (I) - ² Dr., DVM, PhD, Dipl ECVIM-CA, Servei de Medicina Interna, Hospital Clínic Veterinari, Facultat de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spagna (E)

³ Dr., DVM, Studio Veterinario Associato, Via P. Revelli Beaumont 43, Genova (I)

⁴ Dr., DVM, PhD, Dipl ECVIM-CA, Clinic for Small Animal Internal Medicine, University of Zurich, Winterthurerstrasse 260, Zurich, Svizzera (CH) - ⁵ Dr., BSc, PhD, Dirigente di Ricerca, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Reparto di Malattie trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, Roma (I)

⁶ Prof., DVM, PhD, Dipl ECVIP, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università di Padova, Viale dell'Università 16, Legnaro (PD) (I)

⁷ Dr., BSc, PhD, Dirigente di Ricerca, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Reparto di Malattie trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, Roma (I)

⁸ Prof., DVM, Dipl ECVIM-CA Internal Medicine, Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa, V.le Piagge 2, Pisa (I)

⁹ Prof., DVM, PhD, Dipl ECVCP, Dipartimento di Patologia Animale Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano, Via Celoria 10, Milano (I) - ¹⁰ Dr., DVM, Clinica Veterinaria Pirani, Via Majakowski 2/L,M,N, Reggio Emilia (I)

Riassunto

Le Linee Guida su "Diagnosi, Stadiazione, Terapia, Monitoraggio e Prevenzione della Leishmaniosi Canina" del Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina (GSLC) sono elaborate con l'intento di offrire ai medici veterinari un corretto orientamento fisiopatologico, diagnostico, terapeutico e di prevenzione della patologia canina connessa all'infezione da *Leishmania* spp. L'attività del GSLC è fondata sulla medicina basata sull'evidenza, ma nel caso di conflitti o assenza di evidenza viene ricercato un consensus tra i membri del board del GSLC.

Le linee guida sono rivolte ai medici veterinari e non devono essere intese come completamente esaustive ed immutabili. L'intento del GSLC è quello di fornire uno strumento facilmente applicabile alla maggior parte delle situazioni ma che non potrà mai risolvere tutte le problematiche connesse alla leishmaniosi canina.

Le linee guida vengono annualmente aggiornate sulla scorta della revisione dei lavori pubblicati.

Dopo l'approvazione da parte dei membri del board del GSLC, le linee guida ed i loro aggiornamenti vengono divulgati tramite pubblicazione sulla rivista "Veterinaria" e sul sito www.gruppoleishmania.org. I cani leishmaniotici sono stati suddivisi in 5 stadi: 1) Stadio A - esposto; 2) Stadio B - infetto; 3) Stadio C - malato; 4) Stadio D - malato con quadro clinico grave; 5) Stadio E - a: refrattario al trattamento; E - b: con recidiva precoce.

Per quanto attiene alla terapia della leishmaniosi canina, dopo revisione della letteratura, trovano evidenza e consenso le seguenti raccomandazioni:

1. **L'associazione Antimoniato di N-metilglucammina e Allopurinolo è di prima scelta in tutti i soggetti degli stadi B, C e D**, al dosaggio di 100 mg/kg SID sc per 4 settimane di Antimoniato di N-metilglucammina e di 10 mg/kg BID po di Allopurinolo per un periodo di almeno 4-6 mesi. Il dosaggio dell'Antimoniato di N-metilglucammina può essere suddiviso in due dosi da 50 mg/kg BID e protrato, a giudizio del medico veterinario, da un minimo di 4 fino ad un massimo di 8 settimane.

2. **Nei cani inquadrabili nello stadio E**, una volta escluse altre possibili patologie o comunque altri fattori concomitanti (protocollo inadeguato, mancata "compliance" del proprietario) che comportino una scarsa efficacia del farmaco, **potrebbe essere presa in considerazione l'utilità di farmaci alternativi**.

3. **L'Allopurinolo somministrato in monoterapia** e per periodi di almeno 3-6 mesi, alla dose di 10-20 mg/kg BID po, **può essere considerato un protocollo alternativo**, specialmente in quei soggetti che non tollerano la somministrazione di Antimonio di N-metilglucammina, o nei quali gli effetti collaterali degli altri farmaci anti-leishmania siano particolarmente accentuati. Anche la scarsa "compliance" del proprietario può costituire un valido motivo per proporre l'Allopurinolo quale protocollo alternativo.

Summary

Guidelines on "Diagnosis, Classification, Therapy, Monitoring and Prevention of Canine Leishmaniasis" are formulated by the Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG) with the aim to offer to the veterinarian the correct overview on pathophysiology, diagnosis, therapy, and prevention of canine disease caused by Leishmania spp. CLWG activity grounds on evidence based medicine; in case of controversies or absence of evidence in veterinary literature, a consensus is reached among the members.

These guidelines are intended to veterinarians and are not to be thought as totally exhaustive or unchangeable. The aim of this paper is to provide a tool to use in most conditions but that cannot be able to work out all the issues related to canine leishmaniasis.

Guidelines are updated annually based on veterinary literature. Guidelines and their updates are published on "Veterinaria" journal and edited on www.gruppoleishmania.org web-site after their approval by the CLWG members. Dogs affected by leishmaniasis are classified in 5 stages: 1) Stage A - exposed; 2) Stage B - infected; 3) Stage C - sick; 4) Stage D - sick with severe clinical signs; 5) Stage E - a: not responsive to therapy; E - b: early relapse.

After revision of literature, the consensus was reached for the following therapeutic approach to canine leishmaniasis:

1. Meglumine Antimoniate - Allopurinol combination is the first choice in stage B, C and D dogs. Meglumine Antimoniate is administered subcutaneously for 4 weeks at the daily dosage of 100 mg/kg, Allopurinol at the dosage of 10 mg/kg q12h po for at least 4-6 months. Meglumine Antimoniate administration can be divided twice daily (50 mg/kg q12h) and continued up to 8 weeks.

2. An alternative therapeutic approach could be considered in Stage E dogs, using other drugs, when other diseases and concurrent factors (inadequate drug protocol, absence of owner compliance) have been ruled out.

3. Allopurinol administered as single drug at the dosage of 10-20 mg/kg q12h po for at least 3-6 months can be considered an alternative therapeutic approach in all patients presenting contraindications for Meglumine Antimoniate or showing other anti-leishmania drugs side effects. Also, Allopurinol could be suggested when owner compliance is inadequate.

INTRODUZIONE

Nella prima parte delle linee guida¹ è stato descritto l'approccio diagnostico ed è stata presentata la classificazione del cane affetto da leishmaniosi, nonché la gestione del cane leishmaniotico nefropatico proteinurico. In questa seconda parte, la cui pubblicazione è stata anticipata tramite presentazione al Congresso Internazionale Multisala SCIVAC di Rimini 2008, dopo un *excursus* sui farmaci anti-*Leishmania* ad oggi utilizzati o testati nel cane, vengono proposte la gestione terapeutica ed il monitoraggio dei cani infetti o ammalati.

Ancora oggi il trattamento terapeutico del cane leishmaniotico rappresenta una sfida per il medico veterinario, a motivo dell'estrema complessità della patologia che si esprime con una varietà di quadri clinici la cui evoluzione non è facilmente prevedibile.

Gli scopi della terapia anti-*Leishmania* possono essere ricondotti a: i) riduzione (eliminazione) della carica parassitaria del paziente; ii) controllo dei danni indotti dal parassita; iii) ripristino della risposta immunitaria del cane; iv) stabilizzazione nel tempo dei risultati ottenuti; v) trattamento delle recidive. Va premesso che i principali farmaci anti-*Leishmania* sono stati ideati e sviluppati in fasi pre-cliniche e cliniche esclusivamente per la terapia delle leishmaniosi umane e solo successivamente sono stati studiati ed utilizzati nel cane. Le scarse conoscenze sulla risposta

immunitaria dei soggetti ammalati prima, durante e dopo il trattamento terapeutico, contribuiscono a rendere di difficile interpretazione i molteplici insuccessi che si registrano in numerosi casi di leishmaniosi canina. Un altro punto critico della terapia anti-*Leishmania* è la non sempre ottimale interazione farmaco-bersaglio. Queste considerazioni spiegano, almeno in parte, la discrepanza di dati riguardanti molecole che, pur efficaci *in vitro*, non hanno dimostrato efficacia nel cane e, di conseguenza, la scarsità di farmaci leishmanicidi commercializzati. Di seguito sono descritte le molecole che attualmente vengono utilizzate dai medici veterinari in Italia; al termine della trattazione delle singole sostanze, è proposto uno schema clinico-terapeutico applicabile alla gran parte dei casi che quotidianamente vengono portati a visita. La terapia proposta è limitata ai protocolli che prevedono l'uso di farmaci anti-*Leishmania*; non sono prese in considerazione le terapie collaterali, spesso necessarie nel soggetto affetto da leishmaniosi, che richiederebbero ampie e dettagliate trattazioni che esulano da queste linee guida.

Deve essere ricordato che un farmaco anti-*Leishmania*, prima di essere utilizzato nella pratica clinica, dovrebbe essere stato testato nell'ambito di studi clinici randomizzati controllati, adeguatamente potenziati per rilevare eventuali differenze statisticamente significative e clinicamente rilevanti tra il gruppo sottoposto al trattamento oggetto di studio e il gruppo di controllo.

METODOLOGIA

La presente linea guida è stata prodotta sulla base di una revisione sistematica della letteratura riguardante i trattamenti farmacologici della leishmaniosi canina. La ricerca è stata effettuata sulla banca dati biomedica MEDLINE, utilizzando la seguente strategia: (dog* OR canine) AND (drug OR treat* OR therap* OR efficac* OR effect* OR action* OR activit* OR against OR versus) AND (leishm* OR antileishm*) NOT vaccin*, ponendo come limite il titolo dell'articolo. La ricerca è stata inoltre limitata al periodo antecedente Marzo 2008.

Usando i criteri di ricerca sopra riportati, sono stati inizialmente individuati 90 lavori.

La lista completa degli abstracts dei lavori inclusi, ivi compresa una tabella riepilogativa dei dati esaminati, è disponibile sul sito www.gruppoleishmania.org.

Dei 90 lavori individuati 31 sono stati esclusi poiché non riguardano aspetti terapeutici della leishmaniosi canina *in vivo*. I rimanenti 59 articoli sono stati utilizzati dagli autori della linea guida come base scientifica per la produzione delle presenti raccomandazioni. Le carenze metodologiche più frequentemente riscontrate nelle 59 pubblicazioni esaminate riguardano:

- assenza di cecità;
- assenza di gruppo di controllo;
- numerosità campionaria inadeguata agli scopi dello studio;
- gruppi di cani non omogenei e quasi mai paragonabili con quelli di altri lavori analoghi (si pensi ad esempio alla non standardizzazione dei criteri clinici per definire "sintomatico" o "asintomatico" un cane infetto da *Leishmania* spp.);
- estrema variabilità dei criteri diagnostici;
- estrema variabilità dei criteri di "guarigione" clinica e/o parassitologica;
- estrema variabilità dei periodi di *follow-up*, spesso anche temporalmente inadeguati se si considerano i lunghi periodi di tempo caratterizzati dall'assenza di segni clinici rilevabili in un paziente infetto;
- estrema variabilità dei dosaggi e tempi di terapia, anche per lo stesso farmaco utilizzato.

Tali carenze sono amplificate quando i lavori non riguardano una singola sostanza ma propongono prove di efficacia comparativa tra farmaci. Inoltre, i risultati terapeutici estrapolabili dai lavori presenti in letteratura riguardano spesso prove sperimentali, il cui obiettivo primario non è quello della valutazione di efficacia terapeutica del farmaco ma, ad esempio, la valutazione di alcuni parametri della risposta immunitaria *pre* e *post*-terapia.

Gli articoli identificati attraverso la revisione consentono la valutazione dei seguenti farmaci nella terapia della leishmaniosi canina, elencati secondo il numero decrescente di pubblicazioni:

- Antimoniati (numero di studi = 34)²⁻³⁵
- Allopurinolo (numero di studi = 19)^{10-13,20-22,26,29,36-45}
- Amminosidina (numero di studi = 4)^{6,24,46,47}
- Amfotericina B (numero di studi = 3)⁴⁸⁻⁵⁰
- Pentamidina (numero di studi = 1)⁵¹
- Spiramicina/Metronidazolo (numero di studi = 1)⁵²
- Enrofloxacin (numero di studi = 1)⁵³
- Domperidone (numero di studi = 1)⁵⁴

Secondo la strategia di ricerca adottata sono stati individuati singoli studi riguardanti altri farmaci impiegati nella terapia della leishmaniosi canina, in particolare buparvaquone, LiF2 (*Leishmania infantum*-derived fraction 2), prednisone, sodio stibogluconato e trifluralin;⁵⁵⁻⁵⁹ questi farmaci non saranno trattati nel presente lavoro poiché hanno dimostrato effetti benefici trascurabili, oppure perché non utilizzati primariamente per il controllo dell'infezione.

Nell'elenco non è citata la Miltefosina, in quanto nessuno tra gli studi identificati attraverso la revisione valuta il farmaco nella terapia della leishmaniosi canina.

Esclusivamente in virtù della recente registrazione nazionale quale farmaco leishmanicida, sarà fatto cenno alla Miltefosina, utilizzando le informazioni disponibili, legate a pubblicazioni riguardanti prove pre-cliniche, efficacia nell'uomo e, per il cane, abstract di lavori presentati in congressi internazionali.

FARMACI UTILIZZATI NELLA TERAPIA DELLA LEISHMANIOSI CANINA

Composti antimoniali

L'Antimoniato di N-metilglucammina è l'unico farmaco a base di Antimonio pentavalente (Sb^v) utilizzato in Europa sia nel cane che nell'uomo. Nella leishmaniosi viscerale umana, la dose di 20 mg Sb^v (≅ 60 mg del sale)/kg/die per 28 giorni ha una efficacia terapeutica (cioè guarigione clinica e parassitologica senza recidive) intorno al 94-95%.⁶⁰⁻⁶¹ In Italia è disponibile una formulazione per uso veterinario. Il meccanismo d'azione del farmaco, non ancora del tutto chiarito, sembra legato all'inibizione di alcuni enzimi della glicolisi del parassita, fosfofruttochinasi e deidrogenasi piruvica. L'emivita del farmaco nel cane, come dimostrato da Tassi et al.,³¹ è particolarmente breve e risulta pari a 20,5 min quando somministrato per via ev, 42,1 min se impiegato per via im e 121,6 min per via sc. L'eliminazione dell'Antimonio avviene per l'80-95% attraverso il rene nell'arco di 6-9 ore dopo la somministrazione.^{31,32} La buona efficacia clinica del farmaco è descritta in tutti i lavori nei quali è stato impiegato. La riduzione dei segni clinici si osserva in un intervallo di tempo compreso tra pochi giorni ed alcune settimane. Il miglioramento clinico è quasi sempre accompagnato dalla normalizzazione dei parametri dell'emogramma e del profilo biochimico, alcune volte più lenta rispetto al quadro clinico. I tempi di normalizzazione del rapporto sierico albumine/globuline, sono direttamente proporzionali alla dose di farmaco impiegata e quindi ridotti con l'utilizzo di dosaggi più elevati.² La mancata guarigione parassitologica è testimoniata da diversi Autori, con il riscontro di amastigoti di *Leishmania* in diversi tessuti dopo alcuni mesi dalla sospensione del trattamento.^{18,24,40,53} Anche le recidive vengono sovente descritte, in periodi variabili tra alcuni mesi ed uno o due anni; sicuramente le recidive sono più precoci quando il ciclo di terapia è inferiore a 4 settimane. La riduzione della carica parassitaria indotta dal farmaco è in grado di migliorare temporaneamente la risposta cellulomediata dell'ospite.⁷ Inoltre il trattamento spesso induce una diminuzione dei titoli anticorpali. L'effetto collaterale dell'Antimoniato di N-metilglucammina più frequentemen-

te descritto è l'istolesività nel sito di inoculo, specialmente quando il farmaco è somministrato in unica dose giornaliera con volumi superiori ai 2-3 ml. Vengono segnalati, inoltre, rari episodi transitori di anoressia, diarrea e febbre. Tra le alterazioni dei parametri di laboratorio vanno segnalati aumenti transitori delle transaminasi e dell'amilasi.^{17,40} Il ruolo del farmaco nel possibile peggioramento della funzionalità renale del cane affetto da leishmaniosi non è chiaro, poiché nel corso della terapia non è facile attribuire il deterioramento delle condizioni renali alla progressione della malattia o agli effetti del farmaco. Probabilmente, l'uso del farmaco in soggetti con gravi disfunzioni renali non è in grado di determinare un miglioramento della funzionalità renale.¹⁷ Da segnalare anche la descrizione di un episodio di pancreatite acuta.⁴ Il dosaggio più frequentemente utilizzato nei lavori consultati è quello di 100 mg/kg SID sc per un periodo di 4 settimane. Alla luce delle proprietà farmacocinetiche della sostanza, sarebbe utile un dimezzamento della dose totale da somministrare ogni 12 ore, condizione non sempre accettata dai proprietari degli animali malati. Slappendel e Teske,²⁸ hanno dimostrato come l'efficacia del farmaco somministrato per via ev non sia diversa da quella ottenuta utilizzando il farmaco per via sc e che i soggetti trattati per 3-6 settimane alla dose di 100 mg/kg SID sc e ri-trattati alla comparsa di recidive, hanno il 75% di probabilità di sopravvivenza per un periodo superiore a 4 anni. Cicli ripetuti di farmaco possono contribuire alla selezione di ceppi chemioresistenti *in vitro*.¹⁵ Da segnalare, infine, il tentativo di veicolare i composti antimoniai con liposomi, microsfeere cave formate da uno o più strati lipidici, la cui struttura, composizione e proporzioni sono molto simili alla membrana delle cellule dell'ospite. Le prove cliniche, pur dimostrando risultati promettenti,³³ non hanno portato allo sviluppo di una preparazione commerciale, anche in virtù della non completa cura parassitologica degli animali trattati.²⁷

Allopurinolo

L'Allopurinolo è un composto analogo dell'ipoxantina che interferisce con la sintesi dell'acido urico attraverso il blocco della xantina-ossidasi. La sua attività anti-*Leishmania* è dovuta al fatto che le leishmanie, come altri emoflagellati, sono incapaci di sintetizzare le purine, per cui devono necessariamente recuperare le basi azotate ed i nucleosidi dall'ospite ("purine salvage pathway"). L'Allopurinolo, una volta incorporato dal parassita, dà luogo ad alcuni composti tossici che ne determinano la morte. Nella leishmaniosi viscerale umana la monoterapia è inefficace, probabilmente per la scarsità di composto ribosidico (precursore della forma tossica 4-aminopirazolopirimidina) che si forma nell'organismo dell'ospite parassitato.⁶² L'associazione con sale dell'Antimonio pentavalente nell'uomo, invece, mostra effetto sinergico permettendo di abbassare il dosaggio totale di Antimonio.⁶³ Nel cane, quando somministrato in monoterapia, per periodi non inferiori a 2-3 mesi, l'Allopurinolo determina quasi sempre un miglioramento clinico ed in parte dei parametri di laboratorio, compresa la riduzione di alcune proteine della fase acuta.^{36,40,42,45} Analogamente all'Antimoniato di N-metilglucamina, il farmaco, pur riducendo la carica parassitaria, non determina la guarigione parassitologica,⁴⁰ come dimostrato anche dal-

le recidive pressoché costanti dopo poco tempo dalla sospensione della terapia.³⁶ L'Allopurinolo dimostra un'ottima maneggevolezza, anche quando somministrato per periodi molto lunghi (1-2 anni). Segnalata di recente,⁴¹ è la capacità del farmaco, attraverso il controllo della carica parassitaria, di ridurre o mantenere stabile il grado di proteinuria nei cani leishmaniotici proteinurici, e di prevenire/rallentare il deterioramento della funzione renale nei cani infetti non azotemici, come già riportato nella prima parte delle presenti linee guida.¹ Gli stessi Autori, a causa del limitato numero di animali inclusi nel trial clinico, auspicano la conferma di tali dati su un numero di animali maggiore.⁴¹ Il dosaggio dell'Allopurinolo riportato nei lavori nei quali il farmaco è stato utilizzato da solo varia da 5 mg/kg SID po a 20 mg/kg BID po per periodi variabili da 2 a 24 mesi.

Associazione Antimoniato di N-metilglucamina/Allopurinolo

L'associazione tra i due farmaci è il protocollo più utilizzato nella terapia della leishmaniosi del cane. Come dimostrato da Denerolle e Bordoiseau,¹¹ i soggetti trattati con la combinazione dei due farmaci hanno una remissione più duratura se paragonata a quella ottenuta con l'utilizzo delle due sostanze in monoterapia. Un altro dato interessante è la buona tollerabilità di tale associazione farmacologica. Allo stato attuale, tuttavia, nonostante un'ampia utilizzazione dei due farmaci in numerosi lavori sperimentali, non esiste un protocollo di riferimento. Nella pratica il protocollo più frequentemente utilizzato è quello che prevede l'uso di Antimoniato di N-metilglucamina alla dose di 100 mg/kg SID sc (o 50 mg/kg BID sc) per uno-due mesi, unitamente alla somministrazione di Allopurinolo alla dose di 10 mg/kg BID po, da protrarre per molti mesi (alcuni Autori considerano la possibilità di somministrare a vita il farmaco) dopo la remissione clinica. Anche l'associazione Antimoniato di N-metilglucamina e Allopurinolo, pur utilizzata per lunghi periodi, non determina la guarigione parassitologica.^{14,68} Le recidive sono possibili nonostante il protrarsi della terapia.²⁰

Amfotericina B

L'Amfotericina B è un antibiotico polienico prodotto dallo *Streptomyces nodosus*, largamente impiegato nella terapia delle micosi sistemiche. Il meccanismo d'azione del farmaco nei confronti di *Leishmania* spp, sovrapponibile a quello esibito contro i miceti, si traduce in un'inibizione dell'ergosterolo, principale sterolo di membrana sia delle leishmanie che dei funghi, con conseguente formazione di alterazioni strutturali della membrana cellulare e morte dei parassiti.⁶⁴ L'Amfotericina B mostra affinità anche per il colesterolo, componente strutturale della membrana cellulare dei mammiferi, con potenziale tossicità soprattutto a livello tubulare renale. L'Amfotericina B, oltre alla nefrotossicità, può determinare altri effetti collaterali quali febbre, anoressia, vomito e periflebiti. Nella leishmaniosi viscerale umana, regimi di 0,5 mg/kg SID ev per 14 giorni oppure di 20 dosi di 1 mg/kg SID ev a giorni alterni sono relativa-

mente atossici e hanno un'efficacia terapeutica di circa il 97%.⁶⁴ In letteratura sono riportati alcuni esempi di terapia della leishmaniosi canina con Amfotericina B desossicolata, diluita in soluzione salina sterile ed emulsionata con olio di soia.^{48,49} L'utilizzazione del farmaco, pur assicurando risultati soddisfacenti nella maggior parte degli animali trattati, è limitata dalla non facile preparazione e somministrazione dagli effetti collaterali e dalla mancata sterilizzazione dei cani trattati. Il problema della tossicità dell'Amfotericina B è stato di recente quasi del tutto superato con la messa a punto di nuove preparazioni farmaceutiche ad uso umano che prevedono l'incorporazione dell'antibiotico in complessi lipidici. Una di queste formulazioni, costituita da liposomi, è considerata in Europa il farmaco di prima scelta nella terapia della leishmaniosi viscerale dell'uomo. Nell'uomo una dose totale di 18-20 mg/kg somministrata in 2-6 dosi ha un'efficacia terapeutica del 98%.⁶¹ La formulazione liposomiale è stata provata con scarso successo nella terapia della leishmaniosi del cane;⁵⁰ infatti, pur registrandosi buoni risultati clinici, scarsi e temporanei effetti collaterali, non si ottiene la guarigione parassitologica dei pazienti e le recidive sono inevitabili. L'OMS sconsiglia l'impiego del farmaco nel cane, allo scopo di evitare l'insorgenza di ceppi resistenti al principio attivo.

Amminosidina

L'Amminosidina (sinonimo: Paromomicina) è un antibiotico amminoglicosidico prodotto da *Streptomyces chrestomiceticus*, dotato di un ampio spettro di attività antibatterica, comprendente Gram+, Gram- ed acido resistenti, nonché micoplasmi ed alcuni protozoi (*Balantidium coli*, *Enatamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Trichomonas* spp., *Leishmania* spp.). Il meccanismo d'azione dell'Amminosidina nei confronti di *Leishmania* spp. sembra essere identico a quello descritto nei confronti dei batteri: il contatto tra il farmaco ed il microrganismo sensibile comporta la formazione di una proteina carrier di membrana grazie alla quale l'antibiotico riesce a raggiungere elevate concentrazioni intracellulari, con successiva interazione con i ribosomi e conseguente anomala trascrizione di proteine.⁶⁵ Nel cane i fenomeni tossici, quasi sempre reversibili e comuni agli altri amminoglicosidi, sono conseguenti all'accumulo dell'antibiotico nella perilinfia e nell'endolinfia dell'orecchio interno nonché nelle cellule del tubulo renale prossimale, con conseguente possibile alterazione dei parametri della funzionalità renale ed interessamento dell'VIII paio di nervi cranici. Nella leishmaniosi viscerale umana, l'Amminosidina iniettabile ha una efficacia terapeutica del 95% quando viene somministrata alla dose di 11 mg/kg SID im per 21 giorni⁶⁵ e per questo motivo ha trovato valida applicazione terapeutica, specialmente nei casi refrattari ad altri chemioterapici. Altrettanto interessanti appaiono i risultati ottenuti nella terapia della leishmaniosi canina, sia con l'impiego della sola Amminosidina che con l'associazione Amminosidina - Antimoniato di N-metilglucamina. I soggetti trattati con Amminosidina hanno mostrato buoni miglioramenti clinici e riduzione della carica parassitaria.^{24,46,47} Lo studio di Oliva et al.²⁴ ha dimostrato che il protocollo che prevede l'associazione di Amminosidina (5,25 mg/kg BID sc) e di Antimoniato di N-metilglucamina (60

mg/kg SID sc) per 28 gg è da preferire alla monoterapia per il maggior numero di soggetti guariti clinicamente, il minor numero di recidive, la riduzione della carica parassitaria sia midollare che linfonodale e per la significativa riduzione del titolo anticorpale.

Pentamidina

La Pentamidina è un composto diamminico dotato di notevole attività antiprotozoaria ed antifungina. Il suo meccanismo d'azione è poco conosciuto, sebbene sia dimostrato che la Pentamidina è in grado di causare danni al DNA del kinetoplasto ed al complesso mitocondriale dei parassiti.⁵¹ Nell'uomo, a differenza dei composti antimoniai, la Pentamidina dopo somministrazione parenterale, si accumula nel fegato e nei reni, attraverso i quali viene eliminata molto lentamente (50% della dose in 5 gg). Analogamente agli altri composti diamminici può causare numerosi effetti collaterali acuti (ipotensione, nausea, vomito, scialorrea, diarrea, shock anafilattico) e cronici (ipoglicemia, diabete, danni epato-renali, trombocitopenia). Somministrata per via intramuscolare, inoltre, la Pentamidina isotionato, forma salina normalmente presente nelle preparazioni in commercio, è fortemente istolesiva, tanto da provocare la formazione di ascessi nel punto di inoculo. Rhamlem e coll.⁵¹ hanno valutato l'utilizzo della Pentamidina dimetasulfonato in 3 cani colpiti da infezione naturale ed in 5 cani infettati sperimentalmente. La dose di 4 mg/kg SID im per 3 cicli di 8 giorni, con intervallo di una settimana, ha consentito di ottenere un buon miglioramento clinico, associato alla riduzione della risposta umorale ed al miglioramento della risposta cellulomediata.

Spiramicina/Metronidazolo

Pennisi et al.⁵² hanno pubblicato uno studio comparativo tra l'associazione Spiramicina-Metronidazolo e la terapia con l'associazione Antimoniato di N-metilglucamina e Allopurinolo, in cani naturalmente infetti da *Leishmania infantum*; gli Autori hanno utilizzato l'associazione Spiramicina-Metronidazolo poiché è stato dimostrato che il metronidazolo possiede un'attività contro *Leishmania* spp. *in vitro*. Le dosi utilizzate nello studio sono state: Metronidazolo 25 mg/kg SID po e Spiramicina 150.000 UI/kg SID po (13 cani); Antimoniato di N-metilglucamina 100 mg/kg SID sc e Allopurinolo 20 mg/kg BID po (14 cani). Il trattamento è durato 90 gg per entrambi i gruppi di studio. I risultati ottenuti hanno dimostrato un buon miglioramento clinico e degli esami di laboratorio nei due gruppi di trattamento, senza alcuna differenza statisticamente significativa.

Enrofloxacin

I chinoloni inibiscono l'enzima batterico DNA-girasi, responsabile del superavvolgimento del DNA, con conseguente alterazione dell'orientamento spaziale del DNA e conseguente attività battericida. Una similitudine biochimica analoga a quella batterica è presente nella struttura genetica di alcuni Tripanosomi e l'attività dei chinoloni po-

trebbe, quindi, interferire anche sulla replicazione del DNA di alcuni protozoi. È presente un solo trial clinico sull'utilizzo dell'Enrofloxacin in corso di leishmaniosi canina dove è stato studiato l'impiego del farmaco da solo o in associazione con Metronidazolo in soggetti naturalmente infetti da *Leishmania infantum*.⁵³ L'efficacia del farmaco è stata valutata sia *in vitro* che *in vivo*. I test eseguiti *in vitro* non hanno dimostrato un'azione diretta dell'Enrofloxacin sulla *Leishmania* ma un incremento del killing macrofagico e della produzione di ossido nitrico. Lo studio *in vivo* è stato eseguito in 36 cani divisi in 3 gruppi di trattamento (Gruppo 1: Enrofloxacin; Gruppo 2: Enrofloxacin + Metronidazolo; Gruppo 3: Antimoniato di N-metilglucamina + Allopurinolo). I gruppi trattati con Enrofloxacin hanno dimostrato un parziale e poco duraturo miglioramento clinico ed anche gli Autori del lavoro escludono l'impiego del farmaco per la terapia della leishmaniosi canina.

Domperidone

Di recente pubblicazione un articolo che descrive l'utilizzo del Domperidone, un antagonista dei recettori D2 della Dopamina, in 98 cani naturalmente infetti da *Leishmania infantum*.⁵⁴ Il Domperidone aumenta la prolattinemia e l'aumento dei livelli ematici di prolattina può migliorare la risposta immunitaria cellulo-mediata. Il farmaco è stato utilizzato al dosaggio di 1 mg/kg BID po per un mese. Nei successivi 12 mesi sono stati effettuati esami clinici, sierologici, biochimici e immunologici; il Domperidone si è dimostrato efficace nel controllare e ridurre i segni clinici ed il titolo anticorpale. I miglioramenti sono stati più evidenti nei soggetti con segni clinici più lievi (40% di sieronegativizzazione); nella maggior parte dei cani con sintomatologia più severa si è ottenuto un miglioramento clinico ma non associato a sieronegativizzazione. I buoni risultati clinici sono stati confortati da un significativo aumento della risposta immunitaria cellulare, determinata mediante test intradermico alla leishmanina e test di proliferazione linfocitaria.

Miltefosina

La Miltefosina (esadecil-fosfocolina) è un analogo dei fosfolipidi, composto da esteri con diverse catene lunghe sature e insature di gruppi alchilici e la sua attività anti-*Leishmania* è determinata da alterazioni indotte al metabolismo dei fosfolipidi del parassita. L'attività leishmanicida della Miltefosina è stata studiata sia *in vitro* che *in vivo*. I test eseguiti *in vitro* hanno valutato l'attività del farmaco nei confronti di 6 differenti specie di *Leishmania* ed hanno dimostrato una significativa attività sullo stadio promastigote extracellulare e l'aumento del killing macrofagico nei confronti dello stadio intracellulare amastigote. Nella leishmaniosi viscerale umana, la somministrazione di Miltefosina alla dose di 2,5 mg/kg SID po per 28 giorni, mostra un'efficacia terapeutica del 94%.⁶⁶ Studi di farmacocinetica eseguiti su animali di laboratorio e cani, utilizzando la dose di 2 mg/kg BID po per 28 gg (dose attualmente registrata per il cane), hanno dimostrato un assorbimento rapido e completo, una bassa clearance plasmatica, una lunga emivita nei tessuti corporei, un'ampia distribuzione nei tes-

suti bersaglio, una lenta metabolizzazione epatica in colina e l'assenza di eliminazione per via renale. Studi di tossicità negli animali di laboratorio e nel cane evidenziano che la Miltefosina è ben tollerata ai dosaggi registrati per numerose settimane consecutive, non determina nefrotossicità e che gli effetti collaterali gastroenterici sono dose dipendenti. A causa della sua tossicità sull'apparato riproduttore non dovrebbe essere somministrata a cagne gravide, in lattazione e destinate alla riproduzione.

Un recente studio clinico multicentrico ha valutato l'efficacia e la sicurezza dell'associazione Miltefosina e Allopurinolo rispetto alla terapia con Antimoniato di N-metilglucamina e Allopurinolo in cani con infezione naturale da *Leishmania infantum*.⁶⁷ I risultati hanno mostrato una significativa riduzione dello score clinico, la normalizzazione dei dati di laboratorio e la riduzione della carica parassitaria in entrambi i gruppi. Non sono state osservate differenze significative tra i due trattamenti. Come indicato in precedenza, allo stato attuale la Miltefosina non risponde alla chiave di ricerca utilizzata per la stesura delle presenti linee guida.

APPROCCIO TERAPEUTICO

Stadiazione del paziente

Come già descritto nel capitolo delle linee guida riguardante la diagnosi e la classificazione dei cani infetti da *Leishmania infantum*,¹ una diagnosi di certezza e il corretto inquadramento clinico consentono di stadare l'animale infetto da *Leishmania infantum* collocandolo nel gruppo di "esposti", "infetti", "malati" o "malati con quadro clinico grave" (Tabella 1). Lo schema proposto nella Tabella 1 deve essere interpretato alla luce di quanto proposto nel Box 3 della prima parte delle linee guida.¹

Ai quattro stadi inizialmente proposti,¹ ne viene aggiunto un quinto (Stadio E), nel quale vengono inquadrati i soggetti già trattati ma refrattari al trattamento (Stadio Ea) e quelli già trattati ma che recidivano precocemente (Stadio Eb).

È necessario che il clinico, prima di utilizzare un protocollo terapeutico, esegua un esame clinico dell'animale, unitamente all'esecuzione di accertamenti di laboratorio il più completi possibile come proposto nel Box 2 della prima parte delle linee guida, per poter classificare il cane in una delle categorie sopra proposte.¹

STADIO A (esposto): i cani non vanno trattati farmacologicamente ma ricontrollati clinicamente e dal punto di vista sierologico e parassitologico dopo 8-16 settimane dal primo riscontro di positività sierologica.

STADIO B (infetto): i cani devono essere trattati farmacologicamente se l'evidenza del parassita è associata a sieroconversione. In assenza di sieroconversione i soggetti non vanno trattati ma strettamente monitorati clinicamente e sierologicamente ogni 8-16 settimane, per almeno un anno.

STADIO C (malato): i cani devono essere trattati con farmaci anti-*Leishmania*. In questi soggetti, un esame fisico completo e l'esecuzione di un accurato screening di laboratorio consentono di valutare la necessità di terapie collaterali.

Tabella 1
Stadiazione dei cani affetti da leishmaniosi

Stadio	Definizione	Descrizione
A	Esposto	Cane senza alterazioni clinico-patologiche dimostrabili, nel quale i test diagnostici parassitologici risultino negativi ma siano evidenziabili titoli anticorpali specifici, non superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento. I cani esposti solitamente soggiornano o hanno soggiornato in un'area dove è accertata la presenza di flebotomi
B	Infetto	Cane senza alterazioni clinico-patologiche dimostrabili, nel quale è possibile mettere in evidenza il parassita, con metodi diretti (microscopia, coltura o PCR) e con metodi indiretti (presenza di anticorpi specifici)
C	Malato	Cane infetto, nel quale sia dimostrabile qualunque alterazione clinico-patologica riferibile a leishmaniosi e nel quale sia dimostrabile il parassita o titoli anticorpali superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento
D	Malato con quadro clinico grave	Cane malato affetto da: (i) nefropatia proteinurica; (ii) insufficienza renale cronica; (iii) gravi malattie oculari che possano comportare la perdita funzionale e/o richiedano terapie immuno-depressanti; (iv) gravi malattie articolari che possano invalidare la funzione motoria e/o richiedano terapie immuno-depressanti; (v) gravi malattie concomitanti, di natura infettiva, parassitaria, neoplastica, endocrina o dismetabolica.
E	Refrattario Recidivo	(Ea) Cane malato refrattario al trattamento (Eb) Cane malato sottoposto a trattamento, con recidiva precoce

STADIO D (malato con quadro clinico grave). I cani in questo stadio devono essere trattati con farmaci anti-*Leishmania* e con terapie di supporto suggerite dal quadro clinico del paziente.

STADIO E

Sottogruppo Ea (cani malati refrattari al trattamento)

- escludere "false positività";
- rivalutare le alterazioni clinico-patologiche;
- escludere altre patologie (ad es. patologie trasmesse da zecche);
- rivalutare il protocollo terapeutico (dosi, tempi, correttezza di somministrazione, "compliance" del proprietario);
- valutare l'utilizzo di un protocollo terapeutico alternativo.

Sottogruppo Eb (cani malati sottoposti a trattamento con recidiva precoce) vale quanto esposto per il sottogruppo Ea, dando particolare enfasi all'esclusione di altre patologie e alla rivalutazione del protocollo adottato. Le considerazioni riguardanti i cani dello stadio E derivano dalla constatazione che i casi di chemioresistenza sicuramente dimostrati nel cane sono rari, per cui, prima di decidere di sottoporre l'animale ad un protocollo terapeutico alternativo, è necessario escludere tutto ciò che possa interferire con la guarigione e/o la stabilizzazione clinica dell'animale.

Raccomandazioni

Dalla revisione della letteratura il protocollo terapeutico che trova più ampi consensi è l'associazione Antimoniato di N-metilglucammina e Allopurinolo. Tale associazione può essere proposta come prima scelta in tutti i soggetti degli stadi B, C e D, al dosaggio di 100 mg/kg SID sc per 4 settimane di Antimoniato di N-metilglucammina e di 10 mg/kg BID po di Allopurinolo per un periodo di almeno 4-6 mesi. Il dosaggio dell'Antimoniato di N-metilglucammina può essere suddiviso in due dosi da 50 mg/kg BID e protratto, a giudizio del Medico Veterinario, da un minimo di 4 fino ad un massimo di 8 settimane.

Questo protocollo, applicato correttamente, nei cani in

stadio B e C determina quasi costantemente la guarigione clinica ed il suo mantenimento per periodi quasi sempre superiori ad un anno. Gli effetti collaterali sono di scarsa importanza (fatta eccezione per i fenomeni di istolesività dell'Antimoniato che a volte costringono ad interrompere la terapia). Lo schema terapeutico proposto consente anche un drastico abbassamento della carica parassitaria infettante per alcuni mesi e, di conseguenza, un minore tasso di infettività per i flebotomi.

Per i soggetti in stadio D, il protocollo prima citato, pur assicurando allo stesso modo discreti/buoni margini di miglioramento, potrebbe risultare non sufficiente ad assicurare la guarigione clinica dell'animale. Ovviamente, nei cani affetti da "quadro clinico grave", in particolare in quelli già in condizione di insufficienza renale, la prognosi è strettamente correlata alle condizioni cliniche di partenza e alla necessità di indispensabili terapie collaterali.

RACCOMANDAZIONE - L'associazione Antimoniato di N-metilglucammina e Allopurinolo è di prima scelta in tutti i soggetti degli stadi B, C e D, al dosaggio di 100 mg/kg SID sc per 4 settimane di Antimoniato di N-metilglucammina e di 10 mg/kg BID po di Allopurinolo per un periodo di almeno 4-6 mesi. Il dosaggio dell'Antimoniato di N-metilglucammina può essere suddiviso in due dosi da 50 mg/kg BID sc e protratto, a giudizio del Medico Veterinario, da un minimo di 4 fino ad un massimo di 8 settimane.

RACCOMANDAZIONE - Nei cani inquadrabili nello stadio E, una volta escluse altre possibili patologie o comunque altri fattori concomitanti (protocollo inadeguato, mancata "compliance" del proprietario) che comportino una scarsa efficacia del farmaco, potrebbe essere presa in considerazione l'utilità di farmaci alternativi.

Protocolli alternativi

Da quanto emerge dalla letteratura consultabile i farmaci che sembrano dimostrare un'acceettabile azione in alternativa all'associazione di Antimoniato di N-metilglucammina e Allopurinolo nel controllo dell'infezione protozoaria sono, in monoterapia, l'Allopurinolo, l'Amfotericina B, l'Amminosidina e la Pentamidina.

RACCOMANDAZIONE - L'Allopurinolo somministrato in monoterapia e per periodi di almeno 3-6 mesi, alla dose di 10-20 mg/kg BID po, può essere considerato un protocollo alternativo, specialmente in quei soggetti che non tollerano la somministrazione di Antimoniato di N-metilglucammina, o nei quali gli effetti collaterali degli altri farmaci anti-*Leishmania* siano particolarmente accentuati. Anche la scarsa "compliance" del proprietario può costituire un valido motivo per proporre l'Allopurinolo quale protocollo alternativo.

RACCOMANDAZIONE - L'Amfotericina B e l'Amminosidina, pur sperimentati con discreti successi clinici, non trovano valida applicazione pratica per la potenziale nefrotossicità e, per quanto riguarda l'Amfotericina B, anche per le difficoltà di somministrazione.

La Miltefosina, data la recentissima immissione in commercio e la mancanza di dati bibliografici, allo stato attuale non è valutabile.

Monitoraggio e ripresa del trattamento

Analogamente a quanto descritto per il trattamento terapeutico, anche il monitoraggio del cane durante e dopo la terapia deve essere adattato ad ogni singolo caso clinico. Quello riportato di seguito, pertanto, rappresenta uno schema generale.

Per i cani del gruppo B e del gruppo C che sulla base dell'esame fisico e degli accertamenti ematobiochimici non necessitano di terapie di supporto, può essere proponibile il seguente schema:

- esame fisico completo e accertamenti ematobiochimici (Box 1 e 2 della prima parte delle linee guida)¹ alla fine del trattamento con Antimoniato di N-metilglucammina (4-8 settimane);
- se gli esami risultano nei limiti di normalità, continuare con Allopurinolo come indicato in precedenza;
- controlli periodici (come al punto a), ogni 6 mesi, con determinazione del titolo anticorpale e quantificazione della carica parassitaria con qPCR midollare o linfonodale;
- se necessario, riprendere il trattamento con il protocollo di riferimento o con protocolli alternativi nel caso di recidive precoci;
- se la valutazione clinica, e/o i parametri ematobiochimici, non rientrano nei limiti di normalità o non tendono alla normalizzazione alla fine del trattamento terapeutico, inquadrare il cane nel gruppo Ea o Eb e procedere secondo quanto descritto in precedenza;

- per i cani del gruppo D, in particolare in quelli con alterazione della funzionalità renale, deve essere previsto un accurato monitoraggio anche durante il trattamento terapeutico, in alcuni casi ogni 7-10 giorni. Alla fine del trattamento monitorare il paziente ad intervalli molto più ravvicinati (1-2 mesi) rispetto a quelli descritti in precedenza, dando particolare rilievo alla valutazione della/e funzionalità organica/che compromesse dalla malattia.

CONCLUSIONI

Il trattamento terapeutico della leishmaniosi canina rappresenta ancora oggi una sfida professionale ed un problema di non facile soluzione in molti casi portati a visita. Alla luce di quanto emerge dalla letteratura internazionale e dall'esperienza degli Autori è utile sottolineare alcuni concetti che possono essere di aiuto nella gestione terapeutica del cane affetto da leishmaniosi:

- avere la certezza della diagnosi ed escludere/identificare altre patologie concomitanti;
- ottenere un corretto inquadramento clinico del paziente in una delle categorie proposte, dando particolare enfasi alla differenza tra il cane infetto e quello malato;
- scegliere adeguatamente il protocollo terapeutico da utilizzare, dando priorità assoluta ai farmaci per i quali esiste un'ampia letteratura internazionale;
- evitare di associare farmaci con proprietà anti-*Leishmania* senza che le stesse associazioni siano state sperimentate, ricordando che le interazioni farmacologiche possono essere in effetti collaterali non sempre prevedibili;
- quando necessario applicare una corretta terapia collaterale;
- applicare il protocollo terapeutico scelto rispettando tempi e modalità di somministrazione suggerite dalle proprietà farmacocinetiche delle sostanze utilizzate; in altri termini, non "adattare" la terapia a seconda delle circostanze;
- monitorare correttamente il paziente durante e dopo la terapia.

Quanto proposto deve essere inteso come uno strumento capace di applicare quanto più correttamente possibile la terapia anti-*Leishmania*, dove per terapia deve essere intesa la "procedura atta a limitare o eliminare la malattia, i suoi sintomi o i suoi fattori di rischio, o prevenirne le complicanze, per ripristinare possibilmente uno stato di salute e/o benessere e adattamento dell'individuo".

Ringraziamenti

Si ringrazia HILL'S Pet Nutrition Italia per il sostegno dato all'attività del Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina (GSLC).

Si ringraziano i membri del board del GSLC per l'attività svolta a titolo gratuito.

Si ringrazia il Dott. Francesco Nonino, neurologo, epidemiologo - Ce.V.E.A.S. (Centro per la Valutazione dell'Efficacia dell'Assistenza Sanitaria) Area Linee Guida - AUSL di Modena per il prezioso aiuto dato nell'opera di revisione delle presenti linee guida.

Bibliografia

- Castagnaro M, Crotti A, Fondati A, Gradoni L, et al.: 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(3): 19-32, 2007.
- Amusatogui I, Sainz A, Tesouro MA: Effects of antimonial therapy for canine leishmaniasis on antibody titer. *Ann N Y Acad Sci* 849:444-446, 1998.
- Amusatogui I, Sainz A, Tesouro MA: Evolution of serum albumin/globulin ratio after antimonial therapy in canine leishmaniasis. *Ann N Y Acad Sci* 849:447-449, 1998.
- Aste G, Di Tommaso M, Steiner JM, Williams DA, et al.: Pancreatitis associated with N-methyl-glucamine therapy in a dog with leishmaniasis. *Vet Res Commun* 29(Suppl 2):269-272, 2005.
- Barbosa Santos EG, Marzochi MC, Conceição NF, Brito CM, et al.: N-methylglucamine antimonate (SbV+): intralesional canine tegumentary leishmaniasis therapy. *Parasite* 5(2):175-180, 1998.
- Belloli C, Ceci L, Carli S, Tassi P, et al.: Disposition of antimony and aminosidine in dogs after administration separately and together: implications for therapy of leishmaniasis. *Res Vet Sci* 58(2):123-127, 1995.
- Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, et al.: Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally Leishmania infantum-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 59(1-2):21-30, 1997.
- Carrió J, Riera C, Gállego M, Portús M: In vitro activity of pentavalent antimony derivatives on promastigotes and intracellular amastigotes of Leishmania infantum strains from humans and dogs in Spain. *Acta Trop* 79(2):179-183, 2001.
- Chapman WL Jr, Hanson WL, Alving CR, Hendricks LD: Antileishmanial activity of liposome-encapsulated meglumine antimonate in the dog. *Am J Vet Res* 45(5):1028-1030, 1984.
- Cortese L, Pelagalli A, Piantadosi D, Mastellone V, et al.: The effects of prednisone on haemostasis in leishmaniotic dogs treated with meglumine antimonate and allopurinol. *Vet J* 177(3):405-410, 2008.
- Denerolle P, Bourdoiseau G: Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med* 13(5):413-415, 1999.
- Fernández-Pérez FJ, Gómez-Muñoz MT, Méndez S, Alunda JM: Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop* 86(1):83-91, 2003.
- Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portús M: Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec* 136(20):514-516, 1995.
- Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M, Mancianti F: Leishmania infantum infection rates in Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol* 1(4):339-342, 1987.
- Gramiccia M, Gradoni L, Orsini S: Decreased sensitivity to meglumine antimonate (Glucantime) of Leishmania infantum isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 86(6):613-620, 1992.
- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, et al.: Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 88(1-2):13-20, 2002.
- Ikeda-García FA, Lopes RS, Ciarlina PC, Marques FJ, et al.: Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimonate. *Res Vet Sci* 83(1):105-108, 2007.
- Ikeda-García FA, Lopes RS, Marques FJ, de Lima VM, et al.: Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi submitted to treatment with meglumine antimonate. *Vet Parasitol* 143(3-4):254-259, 2007.
- 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82(4):566-567, 1988.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, et al.: Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimonate and allopurinol. *Vet J* 177(2):279-282, 2008.
- Martínez-Subiela S, Bernal LJ, Cerón JJ: Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniasis during short-term treatment. *Am J Vet Res* 64(8):1021-1026, 2003.
- Miranda S, Martorell S, Costa M, Ferrer L, et al.: Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. *Vet Parasitol* 144(3-4):251-260, 2007.
- Moritz A, Steuber S, Greiner M: Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis. *Tokai J Exp Clin Med* 23(6):279-283, 1998.
- Oliva G, Gradoni L, Cortese L, Orsini S, et al.: Comparative efficacy of meglumine antimonate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 92(2):165-171, 1998.
- Riera C, Valladares JE, Gállego M, Aisa MJ, et al.: Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with Leishmania infantum and treated with meglumine antimonate. *Vet Parasitol* 84(1-2):33-47, 1999.
- Rodríguez A, Solano-Gallego L, Ojeda A, Quintana J, et al.: Dynamics of Leishmania-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. *J Vet Intern Med* 20(3):495-498, 2006.
- Schettini DA, Costa Val AP, Souza LF, Demicheli C, et al.: Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimonate. *Braz J Med Biol Res* 38(12):1879-1883, 2005.
- Slappendel RJ, Teske E: The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Vet Q* 19(1):10-13, 1997.
- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, et al.: Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol* 96(4):265-276, 2001.
- Steuber S, Moritz A, Schirrmann I, Greiner M: PCR follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis (CanL). *Tokai J Exp Clin Med* 23(6):285-292, 1998.
- Tassi P, Ormas P, Madonna M, Carli S, et al.: Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimonate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res Vet Sci* 56(2):144-150, 1994.
- Valladares JE, Alberola J, Esteban M, Arboix M: Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimonate to dogs. *Vet Rec* 24;138(8):181-183, 1996.
- Valladares JE, Riera C, González-Ensenyat P, Díez-Cascón A, et al.: Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using an antimony liposomal formulation. *Vet Parasitol* 97(1):15-21, 2001.
- Vouldoukis I, Drapier JC, Nüssler AK, Tselentis Y, et al.: Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage anti-leishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob Agents Chemother* 40(1):253-256, 1996.
- Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pino P, et al.: Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol* 135(2):137-146, 2006.
- Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, et al.: 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, 1999.
- Gothe R, Nolte I, Kraft W: Leishmaniasis in dogs in Germany: epidemiological case analysis and alternatives to conventional causal therapy. *Tierarztl Prax* 25(1):68-73, 1997.
- Liste F, Gascon M: Allopurinol in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Rec* 137(1):23-24, 1995.
- Pasa S, Toz SO, Voyvoda H, Ozbel Y: Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol* 128(3-4):243-249, 2005.
- Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, et al.: Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun* 29(Suppl 2):301-303, 2005.
- Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, et al.: Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniasis (Leishmania infantum). *J Vet Intern Med* 20(2):228-233, 2006.
- Sasanelli M, Paradies P, de Caprariis D, Greco B, et al.: Acute-Phase Proteins in dogs naturally infected with Leishmania infantum during and after long-term therapy with allopurinol. *Vet Res Commun* 31(Suppl 1):335-338, 2007.
- Vercammen F, DeDeken R: Antibody kinetics during allopurinol treatment in canine leishmaniasis. *Vet Rec* 139(11):264, 1996.
- Vercammen F, De Deken R: Treatment of canine visceral leishmaniasis with allopurinol. *Vet Rec* 137(10):252, 1995.
- Vercammen F, Fernandez-Perez FJ, del Amo C, Alunda JM: Follow-up of Leishmania infantum naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Trop* 84(3):175-181, 2002.
- Polí A, Sozzi S, Guidi G, Bandinelli P, et al.: Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 71(4):263-271, 1997.
- Vexenat JA, Olliaro PL, Fonseca de Castro JA, Cavalcante R, et al.: Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidine (paromomycin). *Am J Trop Med Hyg* 58(4):448-453, 1998.

48. Cortadellas O: Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis. *J Vet Intern Med* 17(6):808-812, 2003.
49. Lamothe J: Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 42(4):170-175, 2001.
50. Oliva G, Gradoni L, Ciaramella P, De Luna R, et al.: Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Antimicrob Chemother* 36(6):1013-1019, 1995.
51. Rhalem A, Sahibi H, Lasri S, Jaffe CL: Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol* 71(1):69-76, 1999.
52. Pennisi MG, De Majo M, Masucci M, Britti D, et al.: Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniasis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet Rec* 156(11):346-349, 2005.
53. Bianciardi P, Fasanella A, Foglia Manzillo V, et al.: The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. *Parasitol Res* 93(6):486-492, 2004.
54. Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, et al.: Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *Vet J* 2007 Nov 13. [Epub ahead of print].
55. Vexenat JA, Croft SL, Furtado Campos JH, Miles MA: Failure of buparvaquone (Butalex) in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 77(1):71-73, 1998.
56. Neogy AB, Vouldoukis I, da Costa JM, Monjour L: Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Group of Lupino. Vet Parasitol* 54(4):367-373, 1994.
57. Adamama-Moraitou KK, Saridomichelakis MN, Polizopoulou Z, Kritsepi M, et al.: Short-term exogenous glucocorticosteroidal effect on iron and copper status in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Can J Vet Res* 69(4):287-292, 2005.
58. Reusch C, Reiter I: Imported leishmaniasis of dogs: clinical aspects, diagnosis and therapy with Na stibogluconate (Pentostam). *Tierarztl Prax* 15(3):305-310, 1987.
59. Marques C, Carvalheiro M, Pereira MA, Jorge J, et al.: Efficacy of the liposome trifluralin in the treatment of experimental canine leishmaniasis. *Vet J* 178(1):133-137, 2008.
60. Gradoni L, Bryceson A, Desjeux P: Treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Bull World Health Organ* 73(2):191-197, 1995.
61. Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A: Visceral leishmaniasis treatment, Italy. *Emerg Infect Dis* 9(12):1617-1620, 2003.
62. Shapiro TA, Were JB, Danso K, Nelson DJ, et al.: Pharmacokinetics and metabolism of allopurinol riboside. *Clin Pharmacol Ther* 49(5):506-514, 1991.
63. Di Martino L, Mantovani MP, Gradoni L, Gramiccia M, et al.: Low dosage combination of meglumine antimoniate plus allopurinol as first choice treatment of infantile visceral leishmaniasis in Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84(4):534-535, 1990.
64. Davidson RN: Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs* 56(6):1009-1018, 1998.
65. Sundar S, Rai M: Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 15(6):593-598, 2002.
66. Sundar S, Olliaro PL: Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag* 3(5):733-740, 2007.
67. Miro G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, et al.: Multi-centric and controlled clinical field study to evaluate the efficacy and safety of the combination of miltefosine and allopurinol in the treatment of canine leishmaniasis. *Proceedings of the 6th World Congress of Veterinary Dermatology, Hong Kong, 19-22 November 2008. In: Vet Dermatol* 19 (Suppl 1):7-8, 2008.