



B. Occhipinti

RIASSUNTO

La Leishmaniosi Canina è una malattia protozoaria veicolata da *Leishmania infantum*. In Italia, il Centro ed il Sud sono aree geografiche fortemente enzootiche.

I farmaci convenzionali riconosciuti ed accreditati, mirano ad abbattere la carica del parassita *Leishmania infantum* e vengono distinti in Leishmanicidi e Leishmaniostatici. Ad oggi pochi trattamenti farmacologici sono mirati al potenziamento dell'immunità del paziente, sebbene questa svolga un ruolo predominante nello sviluppo della malattia. In questo studio vengono descritti 12 casi di Leishmaniosi Canina (LC) trattati con citochine *low dose*, Guna-Interleukin 12 4CH e Guna-INF γ 4CH, il cui effetto farmacologico è quello di "educare" il Sistema Immunitario del paziente potenziandone l'attività linfocitaria Th-1. Inoltre, viene evidenziato come l'*overlapping* terapeutico di farmaci convenzionali e citochine *low dose* SKA sia un approccio terapeutico innovativo ed efficace di Medicina Integrata.

PAROLE CHIAVE

LEISHMANIOSI CANINA, MEDICINA INTEGRATA, OVERLAPPING TERAPEUTICO, CITOCHINE LOW DOSE SKA, GUNA-IL 12 4CH, GUNA-INF γ 4CH, IMMUNOPATOLOGIA, SWITCH TH-1/TH-2

SUMMARY: Canine Leishmaniasis is a protozoal disease carried by *Leishmania infantum*. Center and South Italy are highly enzootic areas. Recognized and accredited conventional protocols aim to break down the parasite's charge, and include Leishmanicidal and Leishmaniostatic products.

So far only few pharmacological treatments have dealt with the patient's immunity, although it plays a predominant role in the disease development.

This study describes 12 cases of Canine Leishmaniasis (CL) treated with low dose cytokines, Guna-Interleukin 12 4CH and Guna-INF γ 4CH, whose pharmacological effect is to educate the patient's Immune System to boost Th-1 lymphocytes activity.

Moreover, it is emphasized how the therapeutic overlapping of conventional drugs and low dose SKA cytokines is an innovative and effective therapeutic approach of Integrated Medicine.

KEY WORDS: CANINE LEISHMANIASIS, INTEGRATED MEDICINE, THERAPEUTIC OVERLAPPING, LOW DOSE SKA CYTOKINES, GUNA-IL 12 4CH, GUNA-INF γ 4CH, IMMUNOPATHOLOGY, TH-1/TH-2 SWITCH

LEISHMANIOSI CANINA -OVERLAPPING TERAPEUTICO CON CITOCHINE LOW DOSE NEL TRATTAMENTO DI 12 CASI

CANINE LEISHMANIASIS

- THERAPEUTIC OVERLAPPING WITH LOW DOSE CYTOKINES IN THE TREATMENT OF 12 CASES

INTRODUZIONE

Secondo le Linee Guida "Diagnosi, Stadiazione, Terapia, Monitoraggio e Prevenzione della Leishmaniosi Canina" approntate dal Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina (GSLC), i cani leishmaniotici vengono clinicamente 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 (LC), il GSLC suggerisce i seguenti protocolli:

a. Associazione Antimoniato di N-Metilglucamina + Allopurinolo per tutti i soggetti inquadri negli Stadi B, C e D,

al dosaggio di 100 mg/kg SID s.c. x 4 settimane (fino a 8 settimane max) di Antimoniato di N-Metilglucamina e di 10 mg/kg BID po di Allopurinolo x 4-6 mesi (1).

b. Nei cani inquadri nei sottostadi E (a;b), una volta escluse altre possibili patologie o – comunque – altri fattori concomitanti che comportino una scarsa efficacia dei farmaci (protocollo inadeguato, mancata *compliance*), possono essere presi in considerazione i farmaci alternativi (1).

c. L'Allopurinolo, somministrato in monoterapia per periodi di almeno 3-6 mesi alla dose di 10-20 mg/kg BID po, è considerato un protocollo alternativo (1).

In alcuni Paesi dell'Unione Europea è stata introdotta nel 2007 la terapia orale

con Miltefosina, una alchilfosfolina, analogo sintetico dei fosfolipidi costituenti la membrana cellulare dei Protozoi, che sembrerebbe essere efficace nel trattamento della LC anche in combinazione con l'Allopurinolo (1,2).

Le indicazioni riportate sulle preparazioni commerciali di Antimoniato di N-Metilglucamina, Allopurinolo e Miltefosina (3), in merito alla tossicità, farmacodinamica e farmacocinetica, sono scarse.

– Nella personale esperienza clinica ambulatoriale, il paziente LC sottoposto ad un ciclo di chemioterapico ed Allopurinolo, difficilmente tollera un secondo o un terzo ciclo terapeutico, soprattutto se questi vengono effettuati in tempi ristretti con recidive < 6 mesi.

Nel caso dell'Antimoniato di N-Metilglucamina, i cani trattati accusano: dolorabilità nei punti di iniezione, con segni di aggressività nei confronti dell'operatore somministrante, ulcere cutanee, inappetenza e prostrazione. L'Allopurinolo, se somministrato per lunghi periodi, causa Cistiti da uroliti di xantina ed ematuria.

Infine la Miltefosina, tossica per l'Apparato riproduttore femminile, non dovrebbe essere somministrata in gravidanza, lattazione e a cagne destinate alla riproduzione; inoltre causa vomito e diarrea.

Metabolizzata interamente dal fegato, la Miltefosina non deve essere somministrata ai cani epatopatici.

Queste evidenze cliniche trovano fondamento in letteratura dedicata:

a) "Studio clinico e di istopatologia renale in seguito a somministrazione di Miltefosina e Antimoniato di N-Metilglucamina (N.d.R.: N-Metilglucamina) in cani Beagle sani", Bianciardi *et al.*, 2009 (4).



b) "Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis", Torres *et al.*, 2016 (5).

Secondo quanto riportato, risulta evidente che le terapie convenzionali indicate, sebbene siano efficaci primariamente nei pazienti di Stadio B, C e D, sono gravose e pericolose nel trattamento delle recidive.

Si tratta, inoltre, di protocolli troppo invasivi da utilizzare in pazienti di Stadio A ed E; questi cani restano scoperti da trattamenti farmacologici efficaci.

– L'approccio medico non può prescindere dall'inquadramento globale del paziente, attraverso l'analisi del suo assetto immunitario, stile di vita, esposizione ai vettori (se vive in casa o in giardino, se ha il pelo corto o lungo, se viene protetto da antiparassitari in modo regolare) e se affetto da patologie concomitanti.

In merito al Sistema Immunitario dei soggetti affetti da LC, si ricorda che l'attivazione del Sistema immunocompetente con espressione dei linfociti T *Helper-1* può portare ad una situazione di

quiescenza o alla risoluzione della malattia.

– Nell'evenienza sfavorevole – invece – della *sottomissione* organica dell'ospite, in cui non si attiva l'immunità citotossica, il parassita colonizza progressivamente tutte le strutture del Sistema mononucleato fagocitario (SPM); paradossalmente i macrofagi, che dovrebbero distruggere i parassiti, li ospitano nel proprio citoplasma in grande numero e ne favoriscono la diffusione.

Il lento e continuo contatto dell'agente parassitario con le cellule immunocompetenti è alla base dell'evoluzione patogenetica della LC, in cui si incepa

il Sistema di regolazione dei linfociti T-*naïve* con profondo squilibrio immunitario che evolve verso l'iperfunzione della risposta umorale (iper-produzione di linfociti Th-2) ed anomalie qualitative della risposta cellulo-mediata (ipo-produzione di linfociti Th-1), fenomeno conosciuto come **switch Th-1/Th-2** che porta alla sintomatologia clinica di LC.

Molti protocolli terapeutici non considerano questo importantissimo aspetto immunitario, avendo come scopo l'abbassamento della carica parassitaria circolante, come se solo questo fosse sufficiente a garantire la guarigione clinica.

Il paziente, a causa dello *switch* Th-1/Th-2, non è riuscito a bloccare quell'unico amastigote* che il Dittero flebotomo gli ha inoculato; potenzialmente ogni qual volta l'effetto del chemioterapico si esaurisce, il parassita può ricominciare a replicarsi.

* N.d.R. - Un **amastigote** è una cellula priva di flagelli esterni visibili. Il termine è utilizzato per descrivere una fase del ciclo vitale dei Protozoi.

La sintomatologia del cane infetto è d'intensità direttamente proporzionale al proprio stato d'immunodepressione; più produce linfociti Th-2, più si formano immunocomplessi (2,6,7,8), autoanticorpi (9), focolai di granulomatosi (10-14), amiloidosi (12,14,15) e più la prognosi è infausta.

– Il medico veterinario non può prescindere da queste considerazioni; è opportuno, dopo aver abbassato la carica parassitaria del paziente, concentrarsi sul suo stato immunitario utilizzando le citochine omeopatizzate della *Low Dose Medicine (LDM)*, nello specifico **Guna IL-12 4CH** e **Guna-INF γ 4CH**, unica strategia terapeutica per riconoscere il Protozoo e distruggerlo.

– Questo approccio innovativo prevede l'*overlapping* terapeutico, attività sinergica della Medicina convenzionale e della LDM, in cui queste si potenziano vicendevolmente, portando alla bioregolazione psico-neuro-endocrina-immunitaria del paziente.

Guna-Interleukin 12 4CH e Guna-INF γ 4CH agiscono su **2** fronti:

1. Aumentano l'attività delle cellule NK e dei linfociti T citotossici con *up-regulation* Th-1.
2. Ostacolano l'autoimmunità che la LC induce nei soggetti malati con *down-regulation* Th-2.

È stato dimostrato che IL-12 è in grado di indurre *in vitro* la secrezione della medesima citochina da parte degli splenociti e delle cellule CD11+ con una concentrazione finale rilevata nell'ordine dei nanogrammi.

– La LDM opera all'interno della gamma di concentrazioni fisiologiche delle molecole messaggere al fine di ottenere risultati terapeutici apprezzabili, agendo al di sotto delle concentrazioni alle quali compaiono gli effetti avversi.

In letteratura sono stati proposti vari sistemi per raggiungere questo obiettivo, soprattutto perchè la chemioterapia ingenera effetti fortemente deprimenti la

risposta immunitaria; tuttavia le citochine in dosaggi farmacologici non fisiologici ingenerano effetti tossici importanti.

Grazie alla tecnica farmacologica denominata SKA (*Sequential Kinetic Activation*, Attivazione Cinetica Sequenziale) scoperta, codificata e standardizzata nei Laboratori Guna - Milano, è possibile utilizzare bassi dosaggi di ormoni, neuropeptidi, citochine e fattori di crescita con analoghi risultati terapeutici degli alti dosaggi, senza alcun effetto collaterale (16-19).

Le citochine a bassi dosaggi fisiologici attivate SKA, sono contenute in flaconi da 30ml, in soluzione idroalcolica.

La concentrazione presente nel flacone è nell'ordine di **picogrammi/ml**, corrispondenti alla diluizione omeopatica **4CH**.

- La posologia utilizzata in questo studio è di **10 gocce 2 vv./die** di Guna-IL 12 4CH e di Guna-INF γ 4CH a giorni alterni; somministrazione per via orale a stomaco vuoto (mezz'ora prima dei pasti o 2 ore dopo).



Femmina di *Phlebotomus papatasi*, agente vettore, in Italia, della *Leishmania infantum*.

– Nel resto del mondo la Leishmaniosi canina è trasmessa da Ditteri flebotomi appartenenti al Gen. *Lutzomyia*.

MATERIALI E METODI

Per la diagnosi di LC ci si riferisce ad esami specifici e specifici.

In questa sede vengono illustrate soltanto le metodiche utilizzate per diagnosticare la LC nei **12 pazienti** studiati e le alterazioni che in genere si riscontrano nei casi di LC.

• Esami aspecifici

– Esame emocromocitometrico: in corso di LC si determinano fenomeni immunitari ritenuti responsabili dell'anemia scarsamente rigenerativa e della piastrinopenia (48,5%).

– Esame biochimico: il dosaggio sierologico dell'azoto, della creatinina e l'SDMA forniscono informazioni circa le condizioni renali del paziente; l'esame biochimico non va mai disgiunto dall'esame delle urine e dall'elettroforesi delle proteine sieriche.

– Esame delle urine: la proteinuria è un aspetto costante nella LC.

– Elettroforesi delle proteine: test molto importante in fase di diagnosi in cui si evidenziano l'ipergammaglobulinemia (12,21) ed i picchi policlonali delle gammaglobuline o monoclonali, in caso di malattia cronica (11).

È uno strumento altrettanto importante nei *follow-up* clinici, poiché è l'unico parametro che permetta di constatare in tempo reale l'effettivo miglioramento ed è il solo che autorizzi a sospendere i cicli di trattamento, monitorando le variazioni del rapporto A/G.

• Esami specifici

– **ELISA** (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), test maggiormente utilizzato in questo studio per diagnosticare la malattia, la cui positività è direttamente proporzionale alla produzione di anticorpi da parte del paziente infetto.

– **IFI** - Immunofluorescenza Indiretta.

Nella LC, la diagnostica di laboratorio è molto articolata, così come tutta la patologia; fornisce al medico veterinario i mezzi per poter stadiare il paziente e per decidere quale protocollo utilizzare.

Caso clinico	Età aa	Razza	Ambiente/ Area geografica	Titolo anticorpale Data	Codice Laboratorio	Emocromo	Esame Biochimico	Elettroforesi delle Proteine sieriche	Stadio	Coinfezioni
Jack	5	Jack Russel	Randagio adottato/Sicilia	11.1% 22/06/2018	LZ293285 Lab. Idexx	Nella norma	Nella norma	Nella norma	A	Nessuna
Max	8	Labrador	Casa-giardino/Sicilia	46.8% 10/07/2018	LZ012756 Lab. Idexx	Lieve anemia	Nella norma	Nella norma	A-B	Nessuna
Zack	5	Meticcio	Giardino/Sicilia	52.38% 25/07/2016	188304 Lab. San Marco	Lieve anemia	Nella norma	Ipergammaglobulinemia A/G=0.3	B-C	Nessuna
				50.87% 14/12/2016	191998 Lab. San Marco	Nella norma	B			
				81.7% 6/08/2018	LZ039592 Lab. Idexx	Nella norma	D			
Ambrosia	7	Pastore tedesco	Giardino/Sicilia	Recidiva 15.2% 22/03/2018	LZ195526 Lab. Idexx	Leucocitosi	BUN=32 CREA=2.5	Alfa globuline aumentate A/G=0.4 Elettroforesi nella norma A/G=0.7	E	IRC + Piometra
				31.5% 16/08/2018	LZ048387 Lab. Idexx	Leucopenia e Piastrinopenia	BUN=24 CREA=2.0		E	
Fiona	4	Meticcio	Randaglia/Sicilia	19.27% 6/02/2017	193465 Lab. San Marco	Aumento piastrinico	Nella norma	Ipergammaglobulinemia A/G=0.51	A	TVT + Ehrlichiosi Monocitica Canina
				29.75% 6/10/2017	594799 Lab. San Marco	Piastrinopenia			B	
				8.5% 3/04/2018	LZ203681 Lab. Idexx	Piastrinopenia			B-A	
				103.5% 6/08/2018	LZ039591 Lab. Idexx	Piastrinopenia			D	
Oscar	8	Meticcio	Randagio adottato/Sicilia	Positivo Test rapido Idexx 04/2016	Ambulatorio Pet Sanat	Anemia e Piastrinopenia	Valori epatici alti	Proteine totali 9.2	C	Epatopatia, Ehrlichiosi Monocitica Canina
				19.75% 12/05/2017	1917158 Lab. San Marco	Nella norma	Valori epatici rientrati		A	

TAB. 1

Pazienti LC trattati con farmaci omotossicologici e citochine *low dose*.

In un approccio virtuoso, ad ogni caso clinico andrebbero richiesti tutti gli esami specifici e la titolazione anticorpale ELISA o IFI, in modo da standardizzare la casistica; nella realtà ambulatoriale, in cui la situazione economica del proprietario del paziente è determinante e spesso ostacola indagini frequenti e complete, le deduzioni cliniche e terapeutiche sono strettamente dipendenti solo dall'esperienza del medico veterinario.

► In questo studio, la terapia sperimentale proposta è la seguente:

A) *overlapping* terapeutico per i pazienti di **Stadio B, C e D** che consta di **3 step**:

A-1) 3-4 settimane di protocollo stan-

dard con Antimoniato di N-Metilglucamina + Allopurinolo o Miltefosina + Allopurinolo. Le dosi di somministrazione dell'Antimoniato di N-Metilglucamina sono diverse rispetto a quelle indicate nelle Linee Guida; il farmaco viene somministrato la prima settimana alla dose di **50 mg/kg/die**; in seguito incrementato fino ad arrivare, in seconda settimana, a **100 mg/kg/die**; questo permette l'osservazione clinica del paziente ed il monitoraggio di eventuali effetti tossici.

A-2) Ulteriori 3 mesi, in cui il paziente resta in terapia con Allopurinolo (se tollerato) ed inizia l'assunzione di farmaci drenanti/disintossicanti omotossicologici + assunzione orale di Guna-IL 12 e Guna-INF γ ; questo secondo *step* inizia quando viene sospeso il chemioterapico.

A-3) Assunzione ciclica delle 2 citochine *low dose* SKA.

B) Nei pazienti di **Stadio A e E** si utilizza soltanto la terapia omotossicologica e LDM, in eventuale associazione con Allopurinolo (se tollerato).

I 12 CASI CLINICI

La casistica clinica è stata suddivisa in 2 Gruppi.

– I dati sono aggiornati all'agosto 2018. Trattandosi di LC, il *pool* di pazienti considerato è necessariamente eterogeneo e fornisce alcuni spunti di riflessione al medico veterinario che vi si avvicina, poiché in natura le manifestazioni patologiche non sono standardizzate.

► Pazienti che assumono solo farmaci *low dose*: Jack, Max, Zack, Ambrosia, Fiona, Oscar (TAB. 1).

► Pazienti in *overlapping* terapeutico: Akira, Zoe, Maya, Bart, Aron, Rififi (TAB. 2).

I dati in TAB. 1 evidenziano come la LC (LC spontanea) possa manifestarsi diversamente nel singolo paziente e che possa coesistere con malattie opportuniste ed organiche.

Jack

– Clinicamente presenta epifora e congiuntivite bilaterale. Si prescrive terapia *low dose*: Guna-IL 12 4CH, 10 gtt. BID giorni pari; Guna-INF γ 4CH, 10 gtt. BID giorni dispari; Galium-Heel® gtt., 10 gtt. BID tutti i giorni.

Stadio del paziente: **A**.

Il paziente dopo 1 settimana è clinicamente guarito.

Max

Giunge all'osservazione per zoppia all'arto anteriore destro.

Non è il primo episodio; la zoppia si manifesta almeno 1-2 vv./anno.

Dalla visita ortopedica e dagli studi radiografici si evidenzia artrosi dell'articolazione del gomito bilaterale, probabilmente di origine congenita.

La titolazione ELISA per LC non è bassa, l'elettroforesi è nella norma; si decide – quindi – di trattare il paziente con terapia immunomodulante *low dose*: Guna-IL 12 4CH, 10 gtt. BID, giorni pari x 3 mesi e Guna-INF γ 4CH, 10 gtt., giorni dispari x 3 mesi; Arnica comp.-Heel gtt. x 30 gg. per la zoppia. Stadio del paziente: **A-B**.

Dopo 15 giorni di terapia, il paziente presenta andatura normale; il paziente è clinicamente guarito.

Zack

– Il 25.07.2016 risulta LC positivo. Ig con metodica ELISA (52.38%).

Il paziente viene sottoposto ad *overlapping* terapeutico con Antimoniato di N-Metilglucamina 50 mg/kg SID x 6 giorni ed in seguito 100 mg/kg SID x ulteriori 2 settimane. terminate le 3 settimane di terapia, il cane si ribellava alle iniezioni



FIG. 1

Fiona a inizio e fine terapia.

del chemioterapico ed i proprietari hanno sospeso il trattamento.

Nel frattempo, il paziente assumeva anche Lymphomyosot®, Gunaminoformula e citochine *low dose* per cicli di 4 mesi di terapia, con 1 mese di stop.

Prima recidiva o re-infezione (vive in giardino) a dicembre 2017, dopo 17 mesi, con grave zoppia del treno posteriore. I proprietari si rifiutano di sottoporre il paziente alle iniezioni di chemioterapico ed accettano solo la terapia *low dose*; oltre alle citochine *low dose*; si prescrivono Arnica comp.-Heel cps, Zeel® T cps, Allopurinolo e – al bisogno – 12,5 mg di Prednisolone a stomaco pieno [quando il paziente non si alza da terra, il Prednisolone viene sottodosato, considerato il peso del paziente (35 kg)].

Ad Agosto 2018, Zack è claudicante, molto dimagrito (peso = 28 kg) con atrofia dei muscoli masticatori, linfadenopatia generalizzata, tremori e barcollamento del treno posteriore; riesce – comunque – a muoversi autonomamente e a mantenere la stazione quadrupedale. Le ultime analisi evidenziano la gravità del caso clinico: il titolo anticorpale ELISA è alto; l'elettroforesi molto mossa, ma i proprietari sono amovibili, memori di quanto sia stata sofferta la somministrazione sottocutanea di Antimoniato di N-Metilglucamina nel 2016 e non possono sostenere il costo della Miltefosina.

Il paziente è molto malato, stadio **D**.

La *compliance* dei proprietari non permette di eseguire ulteriore *overlapping* terapeutico.

Ambrosia

La paziente risulta positiva alla LC a luglio 2016, assume terapia convenzionale con Antimoniato di N-Metilglucamina ed Allopurinolo. Dopo 2 anni (Marzo 2018) presenta ottundimento del sensorio, anoressia, Malattia Renale Cronica e Piometra. La Malattia Renale è sicuramente correlata alla presenza di immunocomplessi circolanti che si depositano a livello glomerulare, causando Glomerulonefriti ed Insufficienza Renale Cronica. La Piometra è un'infezione uterina frequente nelle cagne anziane non sterilizzate.

La coesistenza di 3 malattie potenzialmente letali suggerisce un *lavoro* sinergico; spesso accade che la LC, inficiando il Sistema Immunitario, predisponga il soggetto ad altre infezioni e che le stesse creino le condizioni alla *Leishmania infantum* di disseminare in circolo i parassiti.

Probabilmente è per questo motivo che da marzo 2018 ad agosto 2018 è stato registrato un aumento del doppio del titolo anticorpale ELISA nei confronti di *Leishmania infantum*; non si può escludere una recrudescenza della patologia o una nuova infezione, considerando l'esposizione giornaliera della paziente ai flebotomi (vive in giardino).

Altro aspetto da considerare è l'elettroforesi delle proteine, migliorata nello stesso lasso di tempo (da marzo ad agosto 2018).

Si suppone – quindi – che la titolazione ELISA (sia che essa rappresenti un nuovo insulto oppure una recrudescenza) richieda più tempo per normalizzarsi;

l'elettroforesi è più "vicina" allo stato immunitario della paziente che sembra aver "imparato" a potenziare i propri linfociti T *helper*-1 e a controllare i nuovi picchi di LC, motivo per il quale si sceglie di continuare con terapia *low dose* + Allopurinolo + terapia omotosicologica di supporto renale.

Stadio della paziente: **E**.

La paziente presenta clinicamente buona reattività e riesce a controllare altre patologie.

Fiona (FIG. 1)

È uno dei casi clinici più complicati di questo studio, in cui 3 patologie, LC + Tumore Venereo Trasmissibile (TVT) + Ehrlichiosi Monocitica Canina, mettono a dura prova il Sistema Immunitario.

Sin dal momento in cui la paziente è stata accalappiata (era randagia), ha sostenuto trattamenti impegnativi: Vincristina per il TVT e Doxiciclina per l'Ehrlichiosi; poiché la LC era tenuta sotto controllo, le sono stati prescritti solo farmaci disintossicanti e citochine *low dose*.

Fiona ha assunto da Febbraio 2017 ad Agosto 2018 solo Guna-IL 12 4CH e Guna-INF γ 4CH, associate per un breve periodo all'Allopurinolo (sospeso in seguito per Cistite da calcoli di xantina con ematuria). I peggioramenti clinico-sierologici sono stati registrati in estate, stagione di maggior attività del Dittero flebotomo vettore.

Inoltre, poiché affetta da più infezioni croniche, queste sinergizzano e deprimono l'immunità cellulo-mediata, con

espressione clinica della LC.

Stadio della paziente: **D**.

In questi casi è consigliato *overlapping* terapeutico protocollo convenzionale + LDM.

Oscar

Meticcio di Volpino adottato in canile, è risultato positivo a *Leishmania infantum* nell'Aprile 2016; successivamente è risultato positivo anche allo snap 4DX nei confronti di *Ehrlichia canis*. Da 2 anni assume ciclicamente le citochine *low dose*; il titolo per *Leishmania* è rimasto sempre basso, così come l'elettroforesi delle proteine sieriche non ha evidenziato picchi ipergammaglobulinici. L'unica patologia ricorrente è una Dermatite ungueale a carico

Caso clinico	Età aa	Razza	Ambiente/ Area geografica	Titolo anticorpale Data	Codice Laboratorio	Emocromo	Esame Biochimico	Elettroforesi delle Proteine sieriche	Stadio	Coinfezioni	Overlapping terapeutico
Akira	2	Pitbull	Giardino/ Sicilia	Snap Idexx Positivo 03/2015	Ambulatorio Veterinario Pet Sanat			Proteine totali 10.2	C-B	No	Si
Zoe	8	Galgo spagnolo	Perreras spagnole, poi adottata/ Piemonte	IFI 1:320 05/2014	IT048914 Lab. Idexx	Nella norma	Nella norma	Ipergammaglobulinemia Proteine totali 8.8	C	No	No
				Recidiva 17/11/2014					C		Si
				47.3% 21/04/2017					C		Si
				16.9% 13/06/2018					A-B		Si
Maya	8	Rottweiler	Giardino/ Sicilia	9.3% 19/04/2018 2.1% 31/08/2018	LZ223764 Lab. Idexx LZ062468 Lab. Idexx	Nella norma	Nella norma	Rapporto A/G=1	A Negativo	No	Si
Bart	2	Labrador	Terrazzo-casa/ Sicilia	Snap Idexx Positivo ambulatoriale	Ambulatorio Pet Sanat	Nella norma	Nella norma		C-B	No	Si
Aron	1	Labrador	Casa-giardino/ Sicilia	63.6% 23/02/2018	LZ165605 Lab. Idexx LZ013128 Lab. Idexx	Anemia normocitica, normocromica	Nella norma	Rapporto A/G=0.2 Ipergammaglobulinemia	C-D	Ehrlichiosi Monocitica Canina, Anaplasmosi	Si
				83.3% 11/07/2018				Rapporto A/G=0.9 Elettroforesi nella norma	B-C		
Rififi	2	Cirneco dell'Etna	Randagia adottata/ Abruzzo	150.8% 19/07/2018	LZ022879 Lab. Idexx	Anemia	Nella norma	A/G=0.1	D	Ehrlichiosi Monocitica Canina	Si

TAB. 2

Pazienti LC trattati in *overlapping* terapeutico.

- N.d.a.: Zoe è stata inclusa nel Gruppo *overlapping* terapeutico poiché ha iniziato la terapia con citochine *low dose* dopo la prima recidiva.

della zampa posteriore dx; probabilmente la zona è stata sensibilizzata dalla LC ed è soggetta a re-infezioni. Il paziente è clinicamente e sierologicamente reattivo e può essere considerato portatore sano: Stadio A.

Akira

Trattata con un breve ciclo di Antimoniato di N-Metilglucamina che ha causato reazioni cutanee ascessuali nei punti di iniezione, probabilmente per errata somministrazione del farmaco da parte del proprietario. In seguito, nei 2 anni di malattia, ha assunto soltanto le citochine *low dose* Guna-IL 12 4CH e Guna-INF γ 4CH + Allopurinolo BID. Non ha presentato recidive LC, nonostante 2 gravidanze e 2 allattamenti, che stressano molto l'Asse Psico-Neuro-Endocrino-Immunitario e che possono creare le condizioni per la riattivazione del parassita e sua disseminazione in circolo. Nella paziente l'*overlapping* terapeutico ha prodotto ottimi risultati ed è da considerarsi protocollo di elezione quando la somministrazione del chemioterapico diventa difficile.

Zoe

A Maggio 2014 risulta positiva a LC; viene sottoposta ad un ciclo di 30 gg. con Miltefosina e Allopurinolo; la prima recidiva si registra dopo 6 mesi, quando viene personalmente presa in carico e le viene somministrata una terapia disintossicante omotossicologica, per proseguire in seguito con un ciclo di 3 mesi con citochine *low dose* + Macroreg. La seconda recidiva è stata registrata dopo 31 mesi. La paziente viene – quindi – sottoposta ad un nuovo ciclo con Miltefosina + citochine *low dose* + Macroreg. La terza ricaduta, dopo 20 mesi, è soltanto fisica e non trova una correlazione laboratoristica: si tratta di un'improvvisa perdita di peso; per sicurezza è stata sottoposta a *overlapping* terapeutico: Miltefosina + Allopurinolo e, dopo 30 giorni, Macroreg + Guna-IL 12 4CH e Guna-INF γ 4CH. In 4 anni di malattia, il titolo ELISA per anticorpi anti *Leishmania infantum* ha avuto il seguente andamento: 20 febbraio 2015: 60.6%, 1^a recidiva; 6 maggio 2015: 37.7%;



FIG. 2

Aron a inizio e fine terapia.

aprile 2017: 47.3%, 2^a recidiva; dicembre 2017: 24.9%; giugno 2018: 16.9%; agosto 2018, 3^a recidiva.

Si può affermare che l'*overlapping* terapeutico sia stato efficace, in quanto ha allungato i tempi tra una recidiva e l'altra, è di facile gestione e migliora la qualità di vita del paziente.

Maya

Il 18 aprile 2018 risulta positiva a LC, con un titolo anticorpale ELISA basso (9,3%); avendo assunto molti farmaci di sintesi fino alla settimana precedente la visita, è stata inserita nel Gruppo

overlapping terapeutico.

Le è stata prescritta soltanto terapia omotossicologica con cicli di farmaci di drenaggio e Guna-IL 12 4CH e Guna-INF γ 4CH.

Clinicamente la paziente ha avuto una ripresa rapida; il pelo è completamente ricresciuto.

– Il risultato stupefacente è stata la negativizzazione: la titolazione ELISA per *Leishmania infantum* è rientrata a 2.1% (inferiore al range di riferimento).

Si può affermare che immunologicamente Maya ha esibito un'ottima reattività.



FIG. 3

Rifiuti durante la chemioterapia e dopo 3 mesi di terapia con citochine *low dose*.

TAB. 3
Segni clinici e peso, iniziale e all'ultimo controllo, dei 12 case report.

Pazienti	Segni clinici iniziali	Segni clinici ultimo controllo	Peso iniziale	Peso ultimo controllo
Jack	Epifora e congiuntivite bilaterale	Assenti	10.2 kg	10.8 kg
Max	Zoppia arto anteriore destro	Molto migliorato	38.5 kg	38.5 kg
Zack	Zoppia invalidante, atrofia dei crotafiti, onicogriposi	Peggiorato	35 kg	28 kg
Fiona	Dermatite, alopecia, forfora, ulcere ed onicogriposi. Interessamento della cartilagine del tartufo	Molto migliorata; presenta un lieve inarcamento della cartilagine destra del tartufo	25 kg	33 kg
Akira	Manto grigio biancastro, forfora, onicogriposi, cachessia, occhi cerchiati	Guarita	18 kg	29 kg
Zoe	Ulcere cutanee sulle orecchie e cachessia	Ulcere completamente rimarginate, pelo lucido	21 kg	24.5 kg
Ambrosia	Paziente con ottundimento del sensorio, forfora, anoressia, poliuria, polidipsia e cachessia	Guarita, pelo morbido e lucido	27 kg	28.9 kg
Aron	Pelo opaco ed unto, linfoadenomegalia, trigono facciale, cachessia	Pelo lucido, linfonodi normali e tono muscolare +++	28 kg	39 kg
Maya	Assenza di pelo nel padiglione auricolare sn	Guarita e negativizzata	55 kg	55 kg
Rififi	Dermopatia importante con ulcere sul dorso e sul capo, onicogriposi, forfora, cachessia, alopecia	Guarita, permangono una cicatrice alopecica sul dorso ed una sul capo	7 kg	8 kg
Bart	Cachessia, forfora, dimagrimento ed occhi cerchiati	Guarito	25 kg	28 kg
Oscar	Onicogriposi, forfora, alopecia, pelo unto	Guarito a livello dermatologico; permangono problemi ricorrenti al margine ungueale della zampa posteriore dx	6.5 kg	10 kg

Bart

Il paziente, con recente diagnosi di LC, è stato sottoposto ad un ciclo di 30 giorni con Antimoniato di N-Metilglucamina e a ciclo con le citochine *low dose* suindicate; clinicamente è completamente guarito.

Stadio del paziente: **B-C**.

Aron (FIG. 2)

Allo *screening* emato-biochimico del febbraio 2018 risulta positivo ad *Ehrlichia canis*, Anaplasmosi e LC. Inizia terapia con Doxiciclina (10mg/kg/die) per le infezioni veicolate da zecche e con Leishmanicida e Leishmaniostatico; in

terapia si aggiungono nutraceutici (Fergoguna, Colostroni) per supportare il decadimento fisico ed un drenante cellulare (Coenzyme compositum®) x 30 giorni. A fine ciclo, il titolo ELISA risulta ancora molto elevato, ma l'elettroforesi delle proteine evidenzia la normalizzazione delle gammaglobuline. Il paziente continua con i farmaci *low dose*, a cicli di 3 mesi di cura ed 1 di stop; ai controlli successivi emerge un netto miglioramento sia fisico sia ematobiochimico. Dopo 6 mesi dalla diagnosi delle tripli malattie croniche, il paziente fisicamente è completamente guarito e pesa 38 kg (aumento di 11 kg). Si può affer-

mare che il suo Sistema Immunitario si sia potenziato nella componente linfo-citaria Th-1 e sia diventato immunocompetente.

Stadio del paziente: **B-C**.

Rififi (FIG. 3)

Randaglia mai protetta con antiparassitari ed esposta per un periodo non noto a molte infezioni. È il caso clinico più grave tra quelli trattati in questo studio; è positiva a *Leishmania infantum* con una titolazione ELISA pari a 150.8% e all'Ehrlichiosi Monocitica.

Le è stata somministrata terapia convenzionale per entrambe le infezioni e, su-

bito dopo, ha iniziato con farmaci *low dose* e con drenanti omotossicologici. Presentava ulcere profonde sulla gropa, sulla colonna (ad altezza delle prime due vertebre lombari) e su tutto il capo. Dopo 30 giorni di terapia con farmaci di sintesi la situazione dermatologica non era variata: le ulcere erano meno profonde, ma i margini erano più distanti ed era presente alopecia pressochè totale. Negli ultimi 10 giorni ha manifestato poliuria e polidipsia. A fine ciclo sono state ripetute le analisi, includendo un esame urinario per la valutazione della funzionalità renale *in toto*. L'unico valore risultato fuori dal *range* di riferimento è SDMA, indicatore precoce di diminuzione della funzionalità renale. L'ipergammaglobulinemia iniziale è diminuita, le albumine sono aumentate, ma non ai valori normali. Tuttavia, Rififi, dopo l'assunzione dei farmaci di sintesi, ha avuto un miglioramento clinico importante supportato dalla terapia omotossicologica di drenaggio, che permette di *ri-pulire* gli organi emuntori, riattivare il ciclo di Krebs ed il metabolismo cellulare.

La terapia con le citochine *low dose* Guna IL-12 4CH e Guna-INF γ 4CH ha prodotto la *restitutio ad integrum* della cute lesa ed il pelo è ricresciuto ovunque; la paziente è più attiva e meno letargica ed ha incrementato il peso corporeo.

La paziente dovrà assumere le citochine *low dose* in modo continuativo, fino alla normalizzazione degli esami di laboratorio.

► Dall'analisi della **TAB. 3**, si evince che **11** pazienti su **12** hanno registrato un netto miglioramento fisico.

Soltanto un paziente, Zack, è peggiorato, ma, come sopra indicato, la non disponibilità da parte dei proprietari ha inficiato l'*overlapping* terapeutico ed il paziente è destinato ad essere sopraffatto dall'infezione LC.

9 casi clinici su **12** (75%) hanno avuto un incremento ponderale, indice di miglioramento psico-neuro-endocrino-immunitario.

Quando il Sistema Immunitario riacquista le proprie funzioni e contestualmente l'Asse neuro-endocrino si riequilibra, la sintomatologia clinica si attenua.

I pazienti sono meno prostrati, incrementano l'assunzione di alimenti e dal punto di vista psichico sono gioiosi e vitali.

– Questi aspetti gratificano pazienti e proprietari, che si sostengono vicendevolmente lungo il cammino verso la guarigione.

DISCUSSIONE

La complessità della LC è tale da destare preoccupazioni importanti sia ai medici veterinari sia ai proprietari dei cani malati che vivono le sofferenze del proprio animale domestico con apprensione.

La Leishmaniosi Canina è una malattia polimorfa sotto diversi aspetti.

– Sebbene i 12 casi clinici riportati in questo studio siano diversi, rispecchiano – così – la variabilità della malattia, in tutti, ad esclusione di 1 (Zack), si è evidenziato un **ri-equilibrio** dello **switch Th-1/Th-2** con risoluzione della sintomatologia clinica o aumento dei tempi d'insorgenza tra una recidiva e l'altra.

La valutazione terapeutica non può prescindere dagli aspetti che concernono la "gestione del paziente", perché casi clinici sierologicamente positivi, che vivono in aree endemiche, sono esposti a re-infezioni/recrudescenze; è necessario eseguire controlli sierologici frequenti ed associare alle citochine *low dose* la terapia Leishmanicida quando il titolo anticorpale è elevato.

Un altro aspetto da non sottovalutare è la facilità di somministrazione delle citochine *low dose* ed il loro basso costo. ■

Bibliografia

1. G.S.L.C. – Leishmaniosi Canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte II: Approccio terapeutico. Veterinaria, Anno 22, n. 6; Dicembre **2008**.
2. Mateo M., Maynard L., Vischer C. *et Al.* – Multi-centric and controlled clinical field study to evaluate the efficacy and effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. Parasitol Res., 05 (1):155-62; **2009**.
3. Mirò G., Oliva G., Cruz I. *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 leishmaniosis. Vet DERM, 19 (Suppl. I), I-83 (abstract); **2008**.
4. Bianciardi P., Vischer C., Brovida C., Valente M. *et Al.* – Studio Clinico e di Istopatologia renale in seguito a somministrazione di miltefosina e antimonio di N-metilglucamina in cani Beagle sani. Veterinaria, Anno 23, n. 4; Agosto **2009**.
5. Torres M. *et Al.* – Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. Journal of Small Animal Practice Medicine, 57: 299-304; **2016**.
6. Agu W.E., Farrel J.P., Soulsby E.J.L. – Proliferative glomerulonephritis in experimental *Leishmania donovani* infection of the golden hamster. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 4,3,4:353-368; **1981**.
7. Keenan C.M., Hendricks L.D., Lightner L., Webster H.,K., Johnson A.J. – Visceral Leishmaniasis in the German Sheperd Dog I. Infection, Clinical Disease and Clinical Pathology. Vet. Pathol., 21: 74-79; **1984**.
8. Guidi G., Mancianti F., Pieri S., Pistolesi P., Poli A., Bionda A. – Glomerulonefriti in corso di Leishmaniosi nel cane: caratterizzazione della proteinuria ed immunocomplessi circolanti. Atti Soc. Ital. Sci. Vet., 40:489-492; **1986**.
9. Ceci L., Brandonisio O., Carelli G. – Anticorpi anti-muscolo cardiaco nella leishmaniosi del cane. Atti XV Congr. Soc. Ital. Parassit.; **1988**.
10. Anderson D.C., Buckner R.G., Glenn B.L., McVean D.W. – Endemic canine Leishmaniasis. Vet. Phatol., 17:94-96; **1980**.
11. Ceci L., Petazzi F. – Aspetti immunoelettroforetici della leishmaniosi canina. Atti SISVET, 37: 394-396; **1983**.
12. Ceci L., Petazzi F., Guidi G., Corazza M. – Modificazioni immunoelettroforetiche in cani affetti da Leishmaniosi. La Clinica Veterinaria, 108 (4):268-277; **1985**.
13. Duarte M.I.S., Laurent M.D., Brandao Nunes V.L., Rego A.F. Jr., Oshiro E.T., Corbet C.E.P. – Intestinal pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 28, 6:431-436; **1986**.
14. George J.W., Nielsen S.W., Shively J.N., Hopek S., Mroz S. – Canine leishmaniasis with amyloidosis. Vet. Pathol., 13: 365-373; **1976**.

15. Corbeil L.B., Wright-George J., Shively J.N., Duncan J.R., LaMotte G.B., Shultz R.D. – Canine visceral leishmaniasis with amyloidosis an immunopathological case study. *Clin. Immunol & Immunopathol*, 6:165-173; **1976**.
16. D'Amico L. *et Al.* – IL-12 Stimulation T cell Response in Cultures of PBMCs Derived from Small Cell Lung Cancer Patients. *Journal of Cancer Therapy*, 3, 337-342; **2012**.
17. Cardani D. *et Al.* – Oral Administration of Interleukin-10 and Anti-IL-1 Antibody Ameliorates Experimental Intestinal Inflammation. *Gastroenterology Research*, 6(4): 124-133; **2013**.
18. Gariboldi S. *et Al.* – Low Dose oral administration of cytokines for treatment of allergic asthma *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 22, 497-510; **2009**.
19. Radice E. *et Al.* – Low-doses of sequential-kinetic-activated interferon-gamma enhance the ex vivo cytotoxicity of peripheral blood natural killer cells from patient with early-stage colorectal cancer. A preliminary study. *International Immunopharmacology*, 19, 66-73; **2014**.
20. Pizzirani S. – Esperienze diagnostiche della leishmaniosi canina. Osservazioni di un veterinario pratico. *Atti del seminario sulle Mal. Protozoarie*. Ed. SCIVAC, Milano. pp. 97-104; **1985**.
21. Macri B., Muscarella A., Pugliese A., Pennisi M.G. – Studio dei quadri elettroforetici sierici in cani affetti da leishmaniosi a diverso periodo evolutivo. *Praxis Vet.*, 3: 5-7; **1983**.
- Roberti M.L. *et Al.* – Immunomodulating treatment with low dose Interleukin-4, Interleukin-10 and Interleukin-11 in psoriasis vulgaris. *J Biol regular Homeost Agents*, 28 (1):133-9; **2014**.

La Redazione ringrazia gli editor dei siti web da cui sono state tratte le immagini di:

Fig. a p. 50:

<https://www.zampotta.it/proteggere-cane-flebotomi-pulci-zecche/>

Fig. a p. 51:

https://it.wikipedia.org/wiki/Leishmaniosi_animale#/media/File:Phlebotomus_pappatasi_bloodmeal_finished.jpg

Testo elaborato dalla Tesi per il conseguimento del Diploma in Omeopatia, Omotossicologia e Discipline Integrate (PFP) discussa dall'autore in Palermo, 6 Ottobre 2018.
– Relatore: Prof. Leonello Milani

Sono stati inoltre consultati:

- Amusategui I., Sainz A., Tesouro M.A. – Evolution of serum albumin/globulin ratio after antimonial therapy for canine leishmaniasis. *Ann N Y Acad Sci*, 849: 447-449; **1998**.
- Coda S., Nieddu A.M., Xlmenes L.A., Manca M. – Lupus eritematoso sistemico e leishmaniosi viscerale in un cane. *O.D.V.*, 8, 11: 69-72; **1987**.
- Fondevila D., Villafraña M., Ferrer, L. – Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 56, 319-327; **1997**.
- Poli A., Mancianti F., Abramo F., Nigro M., Guidi G. – Glomerulonephritis in dogs infected by *Leishmania infantum*: clinical, histopathological, immunohistochemical and ultrastructural observations. *Procee. 4th Joint Meet. Vet. Pathol. Cordoba (Spain)*: 75; **1986**.
- Popischil A., Fiebiger I., Krampiz H.E., Weiland G. – Experimentelle infektion mit leishmanien beim hund: Klinische, pathologische, parasitologische und serologische befunde. *J. Vet. Med.*, B 34: 288-304; **1987**.

Riferimento bibliografico

OCCHIPINTI B. – Leishmaniosi canina. – *Overlapping* terapeutico con citochine *low dose* nel trattamento di 12 casi. *La Med. Biol.*, **2019/2**; 49-58.

Autore

Dott.ssa Giovanna Barbara Occhipinti
– Medico Veterinario
Via delle Sirene, 70
I – 91022 Castelvetrano (TP)