

virbac **news**

N° 1 Speciale leishmaniosi - gennaio 2013

www.virbac.it



CaniLeish[®]: il primo vaccino
contro la leishmaniosi canina con
AIC europea



Editoriale

Da quarantacinque anni nel mondo dell'Animal Health	3
---	---

Flavio Zanellato

CaniLeish®

Uomini e tecniche	4
-------------------------	---

Jean-Pascal Marc

CaniLeish®: caratteristiche del vaccino

Uno strumento essenziale nella prevenzione della leishmaniosi	5-6
---	-----

Nicoletta Rizzi

Leishmaniosi canina

Un'infezione in espansione	7-10
----------------------------------	------

Daniela Proverbio

Diagnosi della leishmaniosi canina

Speed Leish K e l'interesse delle kinesine	11
--	----

Stefania Rotondi

CaniLeish®: produzione

Un processo di fabbricazione unico	12
--	----

Jean-Louis Belmon

CaniLeish®: studi di efficacia

Un livello di protezione dimostrato sul campo	13
---	----

Nicoletta Rizzi

CaniLeish®: studi di tolleranza

Un buon profilo di sicurezza	14
------------------------------------	----

Nicoletta Rizzi

CaniLeish®: protocollo vaccinale

Tre iniezioni, a tre settimane di intervallo, a partire dai sei mesi	15
--	----

Anna Rondolotti

CaniLeish®

Confrontarsi con il proprietario	16
--	----

Marco Maggi

virbacnews

Pubblicazione a carattere non periodico della Società Virbac e pertanto non soggetta a registrazione ai sensi degli Artt. 2 e 16 Legge n. 47/1948.

Tipografia

A.G.F. Italia

Peschiera Borromeo (Mi)



Da quarantacinque anni nel mondo dell'Animal Health



Flavio Zanellato
Amministratore Delegato
Virbac Italia

“**V**irologie e **B**acteriologie”. È su questi due termini che la famiglia Dick ha fondato nel 1968 Virbac, attualmente una delle prime dieci aziende nel mondo che operano nel settore dell'Animal Health, e tra queste la prima e l'unica totalmente dedicata con le sue attività d'impresa al settore della salute animale.

Oggi Virbac propone al settore veterinario in Europa e in Italia il primo vaccino europeo contro la leishmaniosi canina, vaccino protozoiario, unico nel suo genere, autorizzato dall'EMA (*European Medicines Agency*) nel marzo del 2011, presente sui mercati europei fin dal mese di maggio 2011 e in Italia dal mese di aprile 2012.

Il progetto di ricerca e sviluppo su CaniLeish[®] è iniziato più di 20 anni fa da parte dell'Istituto di Ricerca per lo Sviluppo (IRD) e di BVT (BioVetoTest) azienda che produce attualmente diagnostici per il settore veterinario

e che è parte di Virbac stessa.

Il successo dello sviluppo e della registrazione a livello europeo di CaniLeish[®], unico nella storia della veterinaria, è stato ottenuto oltre che per la capacità di forte investimento anche per la tenacia e la costanza che hanno permesso di superare la complessità di un progetto di questo genere, unite alla coerenza con la “mission” di un'azienda totalmente dedicata a produrre mezzi e strumenti idonei a valorizzare la professione veterinaria e il servizio dei colleghi veterinari ai propri clienti.

CaniLeish[®] è una pietra miliare nella storia della prevenzione della leishmaniosi e fa parte di quelle innovazioni uniche e rivoluzionarie portate nel settore dell'Animal Health da un'impresa.

CaniLeish[®] rappresenta oggi ancora una volta un successo unico per il settore dell'Animal Health dopo molti altri prodotti unici e altamente innovativi che Virbac per

prima ha portato sul mercato veterinario negli ultimi 30 anni.

Questo a conferma dell'impegno e della passione di Virbac nella ricerca nel settore della salute animale, per fornire prodotti e servizi all'avanguardia contro le malattie dei nostri animali e per accompagnare e supportare con coerenza il veterinario nella sua missione professionale: quella di prevenire e di curare le malattie degli animali nel modo più efficace ed efficiente, conferendo prestazioni professionali altamente qualificate. Virbac per questo si rivolge con passione, anche in Italia, esclusivamente al veterinario come partner professionale esclusivo per proporre l'innovazione rivoluzionaria rappresentata oggi da CaniLeish[®].

Un grazie con simpatia alle migliaia di colleghi che anche in Italia hanno già operato adottando CaniLeish[®] per offrire ai loro clienti il massimo della propria professionalità per prevenire la leishmaniosi nel cane.



■ CaniLeish[®]

Uomini e tecniche



CaniLeish[®] è oggi un prodotto disponibile in commercio. La sua creazione è il risultato di una storia fatta di avanzamenti tecnici e di determinazione, che ha portato alla realizzazione del primo vaccino europeo contro la leishmaniosi canina.

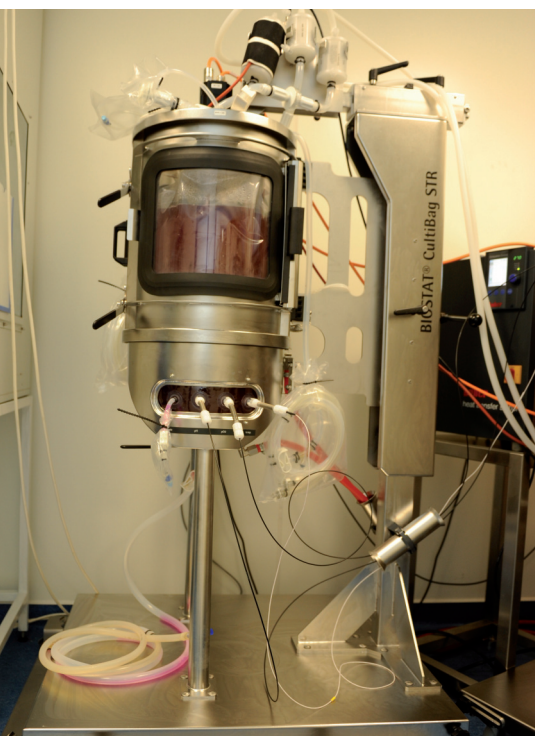
Jean-Pascal Marc, DVM
Direttore Corporate Innovation Product
Gruppo Virbac

Intervista

“I grandi prodotti sono spesso il risultato di una concatenazione di fatti e di invenzioni che, presi singolarmente, avrebbero avuto scarsa eco”.

Come si è articolato lo sviluppo di canileish?

Dapprincipio, Jean-Loup Lemesre, ricercatore dell'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) inventa un terreno di coltura innovativo, che permette di coltivare le leishmanie senza l'ausilio di cellule e siero. Questo “mezzo” di laboratorio facilita la realizzazione delle ricerche sulla composizione antigenica delle Leishmanie, perché le sole proteine che si ritrovano in questo mezzo sintetico sono quelle prodotte dalle Leishmanie.



In questo periodo BVT intuisce l'interesse di questo mezzo di coltura per la produzione di antigeni destinati a test diagnostici, ma scommette anche sulla possibilità di utilizzare questi antigeni per realizzare prototipi di vaccini. Questi prototipi, testati su roditori e soprattutto su cani, mostrano una reazione immunitaria interessante e una protezione. A questo stadio, Virbac, intuendo il potenziale di questi prototipi, acquista BVT; tuttavia bisogna ancora trasformare i promettenti risultati dell'attività di ricerca in un vaccino industriale perfettamente identificato e provarne l'efficacia e la sicurezza.

Per dare un ordine di grandezza: moltiplicare i volumi della coltura iniziale per 5.000.

Questo sviluppo ha rappresentato una vera sfida?

Sviluppare un prodotto come CaniLeish[®] è come leggere un testo complesso mentre si sta imparando a leggere. Le leishmanie secernono antigeni interessanti, alla base dell'attività del prodotto, ma bisogna identificarli, caratterizzarli e quantificarli. Abbiamo quindi dovuto adattare le tecniche analitiche e di coltura, inventarne alcune e mostrare la corrispondenza degli antigeni vaccinali con il patrimonio genetico delle leishmanie. In questo contesto, la coltura di *Leishmania infantum* rappresenta una sfida: questi protozoi sono molto sensibili alle variazioni; per cui il rigore e la precisione di tutti i dettagli produttivi sono essenziali.

È stato anche necessario adattare e inventare dei metodi per valutare l'attività immunologica del prodotto. L'immunità indotta da CaniLeish[®] è di tipo cellulare e scatena fenomeni complessi nelle cellule immunitarie canine, che vanno quantificati. Una delle ultime sfide è stata quella di testare Cani-

Leish[®] sul campo, a partire dal 2007. I metodi utilizzati per riprodurre l'infestazione in laboratorio permettono di valutare solo in parte la protezione, solo l'esposizione a flebotomi infestati rappresenta in realtà quello a cui vanno incontro i cani di proprietà. Per riprodurre questo contesto, abbiamo creato delle “stazioni” che permettono di ospitare i cani all'esterno, in zone fortemente endemiche. Tutto ciò assomiglia al varo di una nave! La risposta l'abbiamo avuta solo due anni più tardi, a causa dello sviluppo molto lento di questa infezione, e poi della malattia.

Perché Virbac è riuscita dove altri hanno fallito?

Noi avevamo una buona base di partenza con il terreno di coltura dell'IRD e delle piste grazie ai lavori della BVT. Nel nostro vocabolario, queste sono basi “robuste”, adatte a essere lavorate. Ma è stato l'impiego da parte nostra di tecnologie di punta che hanno permesso di progredire, di decifrare le basi fondamentali del prodotto, di produrlo in grande quantità, di capire e di spiegare le modalità d'azione.

Alcune tecniche di immunologia cellulare o la proteogenomica, che erano solo agli albori nel 2000, si sono rivelate mezzi cruciali che noi abbiamo saputo utilizzare al meglio.

E le donne e gli uomini di Virbac hanno fatto la differenza: senza la loro determinazione a trovare soluzioni, a capire un prodotto e fenomeni complessi, spesso mai descritti, a non rinunciare mai di fronte ai fallimenti e ai dubbi passeggeri, questo prodotto non avrebbe senz'altro mai visto la luce.

Oggi questo è per noi un'evidenza, ma la sua nascita e la sua costruzione fanno parte della storia di Virbac.

■ CaniLeish[®]: caratteristiche del vaccino

Uno strumento essenziale nella prevenzione della leishmaniosi



“CaniLeish[®] rappresenta una delle innovazioni più grandi in immunologia. È il primo vaccino antiprotozario in Europa diretto contro *Leishmania infantum*”.

Nicoletta Rizzi, DVM
Technical Service
Virbac Italia

“CaniLeish[®] è un nuovo vaccino che deve stimolare una risposta immunitaria appropriata e specifica contro *Leishmania infantum*. Contrariamente alla maggioranza dei vaccini che devono proteggere da malattie virali o batteriche, CaniLeish[®] ha il compito di fornire una protezione contro un parassita intracellulare di natura protozoaria. Per essere effettiva, questa protezione richiede la stimolazione della via immunitaria di tipo Th1 cellulomediata (vedere schema 1).

Proteine parassitarie solubili

Le ESP sono proteine parassitarie solubili prodotte da *Leishmania infantum*. Esse esistono sia negli amastigoti (forma intracellulare del parassita), sia nei promastigoti (forma extracellulare del parassita). Le funzioni che svolgono variano a seconda del diverso stadio di sviluppo di *Leishmania* e contribuiscono, in particolare, all'infezione delle cellule bersaglio dell'ospite da parte del parassita, alla sua moltiplicazione e alla mo-

dulazione della risposta immunitaria dell'ospite.

Alcuni studi mostrano che le ESP stimolano l'immunità cellulare meglio degli estratti proteici di parassiti interi. Una frazione importante di queste proteine appartiene al gruppo dei PSA (*Parasite Surface Antigens*) identificati come bersagli antigenici maggiori in molte pubblicazioni. Questi PSA vengono prodotti da geni altamente conservati nelle diverse specie e ceppi di *Leishmania*.

Stimolare il sistema immunitario

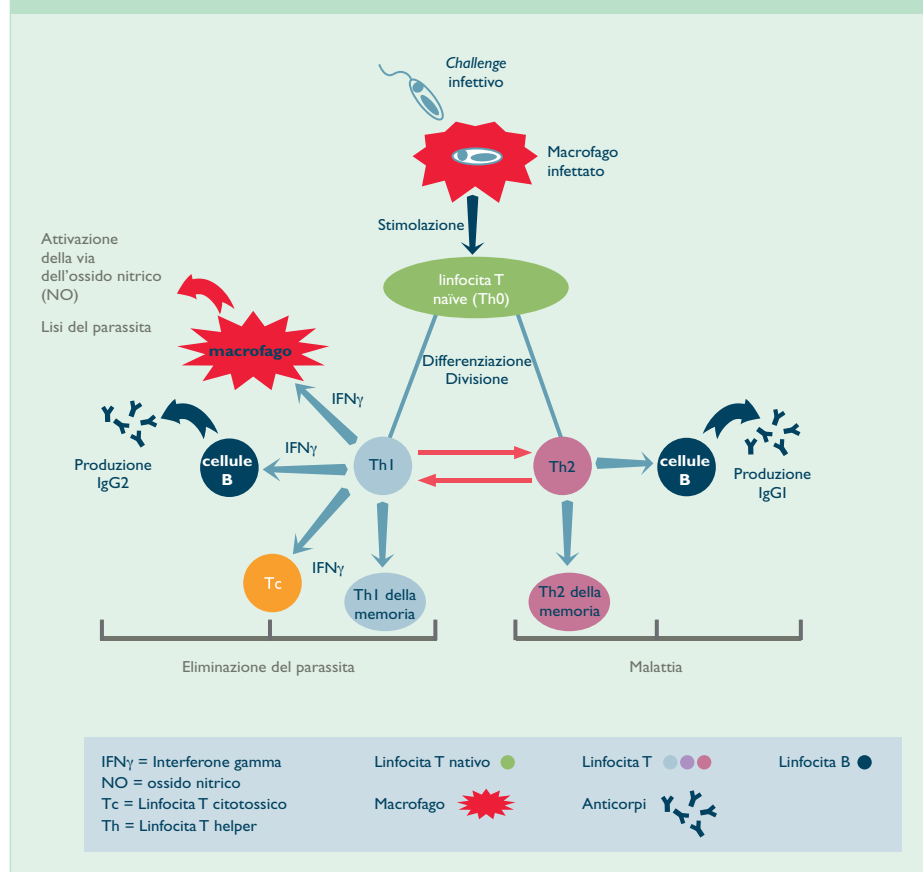
La formulazione di un vaccino inizia con l'identificazione e la caratterizzazione degli antigeni protettivi, che permetteranno di stimolare specificatamente il sistema immunitario.

Nel caso della leishmaniosi, ci troviamo di fronte a un parassita complesso, dal quale è possibile estrarre più di 2.000 proteine. Molte delle proteine hanno un ruolo strutturale o funzionale all'interno del parassita, e non sono necessariamente utili dal punto di vista immunogenico perché non accessibili al sistema immunitario del cane.

La tappa chiave dello sviluppo di CaniLeish[®] è stata quindi la caratterizzazione delle ESP (*Excreted Secreted Proteins*).

Questo gruppo di proteine svolge un ruolo fondamentale nell'instaurarsi dell'immunità contro il parassita e quindi nella protezione contro la malattia: esse sono espresse dal parassita in tutti gli stadi del suo ciclo vitale. L'analisi delle ESP ha permesso di identificare tra 50 e 100 proteine chiave, un numero di gran lunga inferiore a quello del totale delle proteine presenti nell'intero parassita.

Schema 1: Meccanismi immunitari



Grazie a un metodo di produzione unico, è possibile realizzare *in vitro* il ciclo completo del parassita, in uno specifico terreno di coltura. Questo terreno di coltura non prevede la presenza di cellule, né di siero e non contiene altre proteine se non quelle prodotte dal parassita stesso. È dal sumatante della coltura che vengono estratte, mediante diverse tappe specifiche di ultrafiltrazione, le ESP prodotte dal parassita nella loro conformazione nativa.

QA21: adiuvante dal profilo rischio/beneficio ottimale

Per stimolare e orientare correttamente la risposta immunitaria del cane il vaccino ha bisogno di un adiuvante. Questo adiuvante deve permettere di stimolare preferenzialmente la via cellulare Th1, e nello stesso tempo apportare garanzie ottimali in termini di sicurezza. La scelta si è quindi naturalmente orientata sul QA21: una frazione estremamente purificata della saponina Quil-A. Il QA21 ha già mostrato un profilo rischio/beneficio ottimale in altri vaccini per animali (Leucogen®), ma anche in alcuni vaccini umani (QS21).

Durante le fasi di sviluppo di CaniLeish® sono state testate diverse formulazioni, con valutazione della risposta immunitaria cellulare specifica indotta.

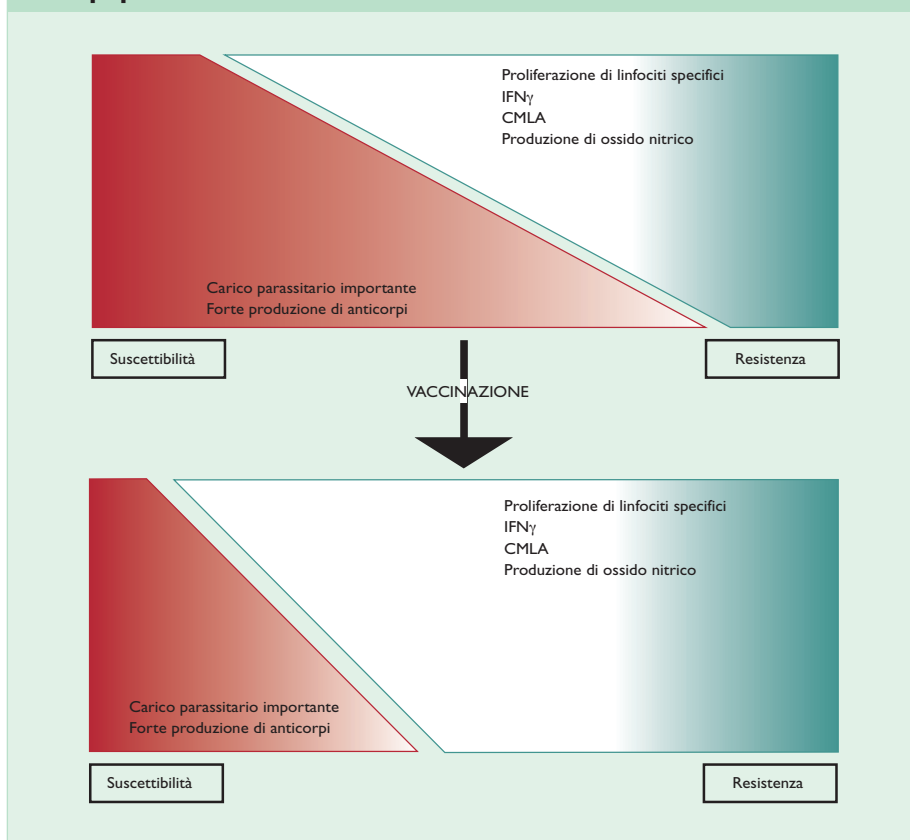
Per ottenere un massimo beneficio protettivo con ampio margine di sicurezza, la formulazione finale contiene 100 µg di ESP associati a 60 µg di QA21.

Indurre una memoria immunologica

La prima richiesta per un vaccino contro la leishmaniosi è quella di indurre una memoria immunologica cellulomediata solida e specifica (risposta di tipo Th1) appropriata per un parassita intracellulare.

La vaccinazione con CaniLeish® porterà all'esposizione degli antigeni ESP al sistema immunitario da parte delle cellule che presentano l'antigene (*antigen presenting cells - APC*). Questo processo stimolerà la proliferazione e la differenziazione dei linfociti Th0 nativi in linfociti Th1, creando un *pool* cellulare memoria in grado di reagire alla

Schema 2: modalità d'azione del vaccino CaniLeish® sulla ripartizione della popolazione



presenza di antigeni di *Leishmania* presentati in modo simile in caso di infestazione ulteriore da parte del parassita. Dopo l'instaurarsi dell'immunità, ogni infestazione parassitaria si tradurrà nella riattivazione dei linfociti Th1 attivati che produrranno in particolare interferone gamma (IFN γ).

Questa citochina consentirà l'attivazione della via dell'ossido nitrico all'interno dei macrofagi che albergano il parassita, che esita nella morte per lisi delle leishmanie. Anche altre vie si attivano, in particolare quelle che implicano l'intervento dei linfociti citotossici. In conclusione, la modalità d'azione del vaccino corrisponde a una stimolazione e a un orientamento della risposta immunitaria verso un profilo cellulare associato a una protezione efficace contro il parassita, a svantaggio di una risposta

umorale peggiorativa (vedere schema 2). Studi sperimentali, consistenti nell'effettuazione di un'iniezione intravenosa di una dose massiccia di parassita un anno dopo la prima vaccinazione, hanno dimostrato le eccellenti capacità protettive di CaniLeish® rispetto allo sviluppo della malattia. Per validare questi risultati sperimentali, è stato necessario realizzare uno studio in condizioni di infestazione naturale, con cani esposti a flebotomi infestati, in zone fortemente endemiche.

Leishmaniosi canina

Un'infezione in espansione



La leishmaniosi canina (Lcan) è una malattia infettiva sistemica a carattere zoonotico che colpisce diversi mammiferi tra cui il cane, i canidi selvatici e l'uomo.

prof.ssa Daniela Proverbio DVM PhD
Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute,
la produzione animale e la Sicurezza Alimentare
Clinica Medica e Diagnostica di Laboratorio
Università degli Studi di Milano

La leishmaniosi canina è causata da protozoi flagellati appartenenti al genere *Leishmania* e si trasmette prevalentemente durante il pasto di sangue di un insetto vettore appartenente al genere *Phlebotomus spp.*

In Europa è causata principalmente da *L. infantum* ed è trasmessa da *P. perniciosus* e *P. perfiliewi*. Il cane è un ospite recettivo ed è considerato il principale reservoir d'infezione (Solano-Gallego et al, 2009). Benchè la trasmissione della malattia avvenga tramite vettore, sono riportate altre possibili fonti di trasmissione: le vie coitale, ematica (tramite la trasfusione di prodotti ematici contaminati) e transplacentare. Un recente studio ha evidenziato la mancanza di trasmissione verticale in seguito al trattamento farmacologico della cagna gravida (Spada et al, 2011). La trasmissione diretta cane-cane è stata ipotizzata negli USA, dove il vettore non è presente, in seguito a casi di infezione autoctoni evidenziati in cani di razza Foxhound (Solano-Gallego et al, 2009).

La Lcan è una malattia in costante crescita e riveste grande importanza in ambito medico veterinario per l'aumento regolare del numero di casi segnalati la cui distribuzione geografica dipende dalla presenza dell'insetto vettore e del reservoir.

Le aree endemiche per Lcan sono le regioni tropicali e sub tropicali (bacino del Mediterraneo, Asia, America centrale e Sudamerica) (Paltrinieri et al, 2010). In Europa la Lcan è endemica in tutti i Paesi che affacciano sul bacino del Mediterraneo ma come effetto della sempre maggior movimentazione dei cani e dell'adattamento dei flebotomi a nuove nicchie ecologiche la Lcan appare in costante espansione verso nord (Germania, Olanda, Nord Italia) (Maroli et al, 2008).

L'Italia è sicuramente uno dei migliori esempi di tale espansione. Tra il 1990 e il 2002 7 focolai di *Leishmania* sono stati identificati in 4 Regioni del Nord Italia considerate precedentemente indenni (Torino e hinterland, Alessandria in Piemonte, Aosta

in Valle D'Aosta, Bologna e Rimini in Emilia-Romagna, Verona in Veneto) con una sieroprevalenza nel cane compresa tra lo 0,7% della zona alpina della Valle d'Aosta e il 9,7% del territorio prealpino della provincia di Torino (Maroli et al 2008). Tra il gennaio



del 2003 e il maggio del 2005 47 casi di Lcan autoctona sono stati identificati in 16 aree differenti del Nord Italia: Torino, Cuneo, Alba, Aosta, Brescia, Pavia e Lecco, Bologna, Piacenza, Modena, Reggio-Emilia, Ravenna, Rimini, Verona, Treviso, Trento. Nello stesso territorio su 5.442 cani asintomatici esaminati, 106 (2,1%) sono risultati sieropositivi alla titolazione anticorpale mediante IFAT con percentuali che andavano dall'1,8% della zona prealpina al 2,6% della zona preappenninica e collinare della valle del Po (Maroli 2008). Nella maggior parte dei territori esaminati sono inoltre stati rilevati numerosi casi di Lcan importati (81, pari all'1,5%), costituiti da cani che viaggiavano o provenivano da aree endemiche del Sud Italia (Maroli et al, 2008).

Benché la sieroprevalenza nelle Regioni del Nord Italia sia molto minore rispetto a quella delle aree del Sud classicamente endemiche (40% di sieropositività sulle coste tirreniche), ad oggi queste Regioni sono da considerare focalmente endemiche (Maroli et al, 2008).

Un altro studio condotto su 313 cani presenti presso il canile sanitario di Milano (area ancora oggi considerata indenne) ha mostrato una sieroprevalenza dello 0,3% (Perego et al, 2005)

Patogenesi

Il sistema immunitario dell'ospite e il tipo di risposta immunitaria umorale o cellulo-mediata attivata verso il parassita hanno un ruolo fondamentale nel determinare l'esito dell'infezione da *Leishmania*. I linfociti T helper CD4+ possono indirizzare il sistema immunitario verso una risposta umorale (Th2) non protettiva contro *Leishmania* o verso una risposta cellulo-mediata (Th1), protettiva ed efficace. I cani infetti e sani sono contraddistinti da una lieve o assente risposta Th2 e da una risposta Th1 specifica contro *Leishmania*, i cani infetti e clinicamente malati presentano un'esagerata risposta Th2 e una lieve o assente risposta Th1. La risposta immunitaria di tipo umorale si dimostra spesso dannosa oltre che scarsamente efficace. L'eccesso di anticorpi è infatti sovente responsabile di numerose

alterazioni clinico-patologiche che si riscontrano in corso di Lcan (Solano-Gallego et al, 2009, Paltrinieri et al, 2010).

Approccio diagnostico

Di fondamentale importanza per diagnosticare correttamente la Lcan è l'impiego di un approccio integrato che tenga conto di segnalamento, anamnesi prossima e remota, rilievi clinici e clinico patologici e test diagnostici diretti e indiretti.

1. Segnalamento e anamnesi

Il rischio di venire a contatto con il vettore è maggiore per cani randagi, da lavoro o che vivono in zone rurali (Moreno et Alvar, 2002). La malattia può colpire soggetti di qualunque età, benché mostri una distribuzione bimodale colpendo principalmente soggetti sotto i 3 anni o tra gli 8 e i 10 anni (Moreno et Alvar, 2002). È stata anche ipotizzata una predisposizione del sesso maschile così come descritto nell'uomo e nel criceto (Solano-Gallego et al, 2009, Paltrinieri et al, 2010).

Tutte le razze canine possono essere colpite da Lcan, anche se Pastore tedesco e Boxer sembrano essere maggiormente predisposti (Paltrinieri et al, 2010). Al contrario i cani di razza Podenco ibicenco, autoctoni dell'isola di Ibiza (Spagna), sembrano presentare una risposta cellulomediata estremamente forte nei confronti dell'infezione da *L. infantum* e raramente manifestano la forma clinica (Solano-Gallego et al, 2000). Questo dato sembra avvalorare l'importante ruolo rivestito dalla genetica dell'ospite nella patogenesi della malattia.

Importante un'accurata anamnesi ambientale che indaghi se l'animale vive o ha soggiornato in aree endemiche e se sono stati effettuati trattamenti ad azione repellente verso i flebotomi, anche se l'uso di repellenti non permette di escludere la leishmaniosi dalle diagnosi differenziali (Solano-Gallego et al, 2009, Paltrinieri et al, 2010).

2. Alterazioni cliniche e di laboratorio

Le manifestazioni cliniche sono estremamente varie in funzione della risposta immunitaria instaurata dall'ospite, dei differenti

meccanismi patogenetici coinvolti e dei diversi organi interessati. I segni clinici di più frequente riscontro sono lesioni cutanee (dermatite secca esfoliativa, ulcerativa, nodulare, papulare, pustolosa sterile), linfoadenomegalia generalizzata, splenomegalia, perdita di peso, letargia, lesioni oculari, epistassi e poliuria, polidipsia conseguenti alle alterazioni renali (Solano-Gallego et al, 2009).

Gli esami di base necessari per la diagnosi sono esame emocromocitometrico, profilo biochimico sierico con valutazione della protidemia totale ed elettroforesi sieroproteica, associata a parametri di funzionalità renale quali urea, creatinina ed esame delle urine con UP/UC per la valutazione della proteinuria e la determinazione di glicemia ed enzimi epatici (ALT, ALP). Le alterazioni di laboratorio di più frequente riscontro sono iperprotidemia, ipergammaglobulinemia policlonale, ipoalbuminemia, innalzamento della creatinina, anemia scarsamente o non rigenerativa, trombocitopenia, proteinuria.

3. Diagnosi

La diagnosi definitiva di Lcan si esegue mediante metodi diretti e indiretti: i primi si basano sulla ricerca diretta del parassita (citologia, istologia, immunoistochimica) o del suo DNA (PRC), i secondi sul riscontro di anticorpi prodotti dall'ospite contro *Leishmania* (IFAT, ELISA).

L'evidenziazione diretta del parassita mediante esami citologici/istologici (su lesioni cutanee, linfonodi, milza, midollo osseo) ha una specificità del 100% ma pecca in sensibilità per l'alto numero di risultati falsi negativi.

Attualmente i due approcci diagnostici maggiormente utilizzati per valutare l'infezione in soggetti infetti o malati si basano sulla ricerca di anticorpi specifici anti *Leishmania* (IFAT e ELISA) e sulla dimostrazione della presenza di DNA parassitario nei tessuti dell'ospite mediante PCR (Solano-Gallego et al, 2009).

L'IFAT è raccomandata dall'Oie come metodo sierologico di referenza (specificità e sensibilità prossime al 100%). Nelle in-

Tabella

Classificazione	Segni clinici	Alterazioni clinico patologiche	Sierologia	PCR	Terapia
Esposto	No	No	Positiva a bassi titoli ($< 4v$ cut off)	Neg	No, visita clinica, sierologia e PCR dopo 8-16 settimane
	No	No	Positiva a bassi titoli ($< 4v$ cut off)	Pos	No, visita clinica, sierologia e PCR ogni 8-16 settimane per almeno 1 anno
Malato	Sì	Sì	Positiva ad alti titoli ($\geq 4 v$ cut off) (*)	Pos	Sì, trattamento leishmanicida associato eventualmente a ulteriori terapie di supporto (necessaria stadiazione clinica)

* talvolta i soggetti malati possono avere titoli anticorpali negativi o inferiori a 4 volte il cut off del laboratorio. Alti titoli anticorpali (> 4 volte il cut off) sono da considerarsi diagnostici. (Oliva et al, 2010, Solano-Gallego et al, 2009).

fezioni naturali in un periodo che varia tra 1 e 22 mesi (media 5 mesi) i cani infetti vanno incontro a sieroconversione producendo un livello di anticorpi individuabile mediante IFAT (Moreno, Alvar, 2002), ma solo nei cani con disseminazione del parassita questo titolo anticorpale tende ad essere alto o in costante aumento. Quindi, alti livelli anticorpali (con titoli che superano di almeno 4 volte il cut off di riferimento del laboratorio) sono conclusivi per la diagnosi di Lcan mentre livelli bassi non sono necessariamente indicativi di malattia e possono indicare soltanto un contatto con il parassita (Solano-Gallego et al, 2009).

L'uso della PCR permette di identificare anche una sola traccia del DNA del parassita nel tessuto analizzato, aumentando molto la sensibilità e la specificità della diagnosi parassitologica rispetto alla ricerca diretta del parassita in toto. La sensibilità della PCR varia molto in funzione del tessuto analizzato: la sensibilità maggiore si ha nel caso di impiego di midollo osseo, linfonodo o milza, mentre appare decisamente inferiore nel caso del sangue (Solano-Gallego et al, 2009). Per poter emettere una corretta diagnosi però è di fondamentale importanza analizzare le informazioni ottenute dalla PCR alla luce delle alterazioni cliniche, degli esami di laboratorio e della valutazione sierologica.

L'infezione da *Leishmania* può evolvere in tempi variabili con quadri clinici e clinicopatologici estremamente polimorfi. È comunque indispensabile saper riconoscere

un soggetto esposto, infetto o malato.

Viene definito cane **esposto** un soggetto clinicamente sano nel quale l'identificazione del parassita (cito-istologia, coltura, PCR) risulta negativa mentre il titolo anticorpale specifico è positivo ma inferiore a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento. Si tratta di un soggetto che è venuto a contatto con il parassita, lo ha eliminato e ha sviluppato un moderato titolo anticorpale.

Viene definito cane **infetto** un soggetto clinicamente sano, senza alterazioni clinico patologiche compatibili con Lcan, nel quale l'identificazione del parassita (cito-istologia, coltura, PCR) risulta positiva mentre il titolo anticorpale specifico è positivo e generalmente inferiore a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento. Si tratta di un soggetto che è venuto a contatto con il parassita, non lo ha eliminato, ma possiede una risposta anticorpale tale per cui l'infezione viene tenuta sotto controllo. La maggior parte dei cani infettati non sviluppa sintomi clinici o alterazioni clinico patologiche, infatti la prevalenza della malattia nelle regioni endemiche è spesso inferiore al 10%.

Viene definito cane **malato** un soggetto con sintomi clinici e/o alterazioni clinico patologiche compatibili con Lcan nel quale l'identificazione del parassita (cito-istologia, coltura, PCR) risulta positiva e il titolo anticorpale specifico è positivo solitamente con titolazioni anticorpali superiori a 4 volte il valore soglia (Oliva et al, 2010, Solano-Gallego et al, 2009).

La gestione delle diverse tipologie di pazienti è differente ed è riassunta nella tabella.

La terapia

I cani malati di Lcan richiedono trattamenti farmacologici mirati. L'approccio terapeutico attuale prevede due principali opzioni terapeutiche. La più classica è a base di antimoniato di N-metilglucamina, leishmanicida, alla dose di 100 mg/kg/SID per via sottocutanea (possibile suddividere in 2 dosi giornaliere) per minimo 4 settimane, associato alla somministrazione orale di allopurinolo, leishmaniostatico, alla dose di 10 mg/BID per almeno 4-6 mesi. Gli effetti collaterali dell'antimoniato sono principalmente dolore nel sito di inoculo del farmaco con eventuale formazione di ascessi o cellulite e potenziale nefrotossicità. È dunque necessaria un'accurata valutazione della funzionalità renale prima e durante la somministrazione del farmaco. Gli effetti collaterali dell'allopurinolo sono invece estremamente rari e legati a xantiniuria o formazione di uroliti di xantina (Noli e Auxilia, 2005).

La seconda innovativa opzione terapeutica, di più recente disponibilità, è la miltefosina: farmaco ad azione leishmanicida con via di somministrazione orale. Il protocollo prevede la somministrazione di miltefosina alla dose di 2 mg/kg/SID per os per 4 settimane associata ad allopurinolo alla dose di 10 mg/kg/BID per os per 6-12 mesi. Gli effetti collaterali della miltefosina sono vomito, diarrea, abbattimento, per lo più autolimitanti (Woerly et al, 2009, Mateo et al, 2009).

Indipendentemente dal farmaco utilizzato, nella maggior parte dei casi i soggetti trattati vanno incontro a un miglioramento clinico e clinico patologico, variabile a seconda della risposta immunitaria dei soggetti, con tempi liberi da malattia molto variabili da un soggetto all'altro, ma solo raramente il trattamento porta alla completa sterilizzazione del soggetto. Per questo spesso sono necessari diversi cicli di terapia durante la vita del cane.

Sono stati effettuati diversi studi che hanno confrontato tossicità ed efficacia delle molecole con azione leishmanicida (vedere riquadro).

Profilassi e prevenzione

Per diminuire il rischio di esposizione al vettore, i cani che si trovano in aree endemiche e principalmente durante la stagione estiva quando i flebotomi sono maggiormente attivi, devono essere tenuti in casa, dal crepuscolo all'alba, e sottoposti a trattamenti con insetticidi topici a base di permetrine/deltametrine disponibili in formulazioni spray, spot on o collari.

La vaccinazione

Recentemente è stato commercializzato in Europa CaniLeish®: vaccino inattivato per la prevenzione della Lcan composto da proteine escrete-secrete (ESP) purificate

Proverbio D, Perego R., Spada E., Bagnagatti De Giorgi G., Milici A., Ferro E.
Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la produzione animale e la Sicurezza Alimentare
Clinica Medica e Diagnostica di Laboratorio
Università degli Studi di Milano

Leishmaniosi canina: comparazione in campo dell'efficacia di antimonio di N-metilglucamina e della combinazione miltefosina-allopurinolo

I composti antimoniali sono stati considerati per anni i farmaci di prima scelta nel trattamento della leishmaniosi canina. Dal 2007 è stata registrata una nuova molecola ad uso orale, la miltefosina. Lo scopo di questo studio è stato valutare l'andamento clinico (mediante l'applicazione di uno score), i parametri ematici e urinari ed eventuali effetti collaterali in 10 cani leishmaniotici trattati con miltefosina e allopurinolo e di comparare questi dati con un gruppo di controllo costituito da 10 cani leishmaniotici trattati con antimonio di N-metilglucamina. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a visita clinica, compilazione dello score clinico, esame del sangue e delle urine ai giorni 0, 30, 60 e 90 dall'inizio della terapia. I cani di entrambi i gruppi hanno mostrato un miglioramento delle alterazioni cliniche ed ematologiche. I cani trattati con antimonio, a differenza di quelli trattati con miltefosina, hanno evidenziato alterazioni dei parametri indicatori di sofferenza epatica e renale. In entrambi i gruppi gli effetti collaterali sono stati di lieve entità e breve durata. Durante il follow up di 90 giorni nessun cane in entrambi i gruppi ha presentato ricaduta.

di *L. infantum* prodotte in mezzi di coltura privi di cellule e di siero. Tale vaccinazione ha lo scopo primario di ridurre la probabilità che un soggetto venuto a contatto con *Leishmania* passi dallo stato di infetto a quello di malato inducendo una specifica immunità cellulomediata. Il prodotto deve essere utilizzato in cani che abbiano superato i 6 mesi di vita. Il protocollo iniziale prevede

3 vaccinazioni effettuate a 3 settimane di distanza ciascuna (settimana 0, 3, 6) in soggetti certamente non affetti da leishmaniosi con successivi richiami annuali. Tre settimane dopo il completamento del ciclo primario di vaccinazione si osserva una rapida insorgenza della capacità parassiticida mediata dai Th1 che si mantiene per almeno un anno.

Bibliografia

- Maroli M., Rossi L., Baldelli R., Capelli G. et al. - The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health*. 2008 Feb;13(2):256-64.
- Mateo M., Maynard L., Vischer C., Bianciardi P., Miró G. - Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2009 Jul;105(1):155-62.
- Moreno J., Alvar J.L. - Canine Leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. (2002) *Trends Parasitol*. 18, 399-405.
- Noli C., Auxilia S.T. - Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol*. 2005 Aug;16(4):213-32.
- Oliva G., Roura X., Crotti A., Maroli M. et al. - Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2010 Jun 1;236(11):1192-8.
- Paltrinieri S., Solano-Gallego L., Fondati A., Lubas G. et al. - Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2010 Jun 1;236(11):1184-91.
- Perego R., Proverbio D., Spada E., Ferro E. - Canine leishmaniasis: a sero-epidemiological survey by indirect fluorescence antibody test (IFAT) in 313 dogs at "Canile Sanitario" of Milan. *SISVet Viareggio (LU)* 2005, 273-4.
- Solano-Gallego L., Lull J., Ramos G., Riera C. et al. - The Iberian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*. 2000 Jun 10;90(1-2):37-45.
- Solano-Gallego L., Koutinas A., Miró G., Cardoso L. et al. - Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2009 Oct 28;165(1-2):1-18.
- Spada E., Proverbio D., Groppetti D., Perego R. et al. - First report of the use of meglumine antimoniate for treatment of canine leishmaniasis in a pregnant dog. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2011 Jan-Feb;47(1):67-71.
- Woerly V., Maynard L., Sanquer A., Eun H.M. - Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2009 Aug;105(2):463-9.

Diagnosi della leishmaniosi canina

Speed Leish K e l'interesse delle kinesine

“Un test per individuare e diagnosticare la leishmaniosi richiede performance ottimali tanto per sensibilità che per specificità”.

Stefania Rotondi
Product Manager
Virbac Italia



“Recenti dati epidemiologici mostrano un'importante prevalenza della leishmaniosi in tutto l'arco del Mediterraneo, con una progressiva estensione della zona di enzoozia verso il Nord dell'Europa.

La situazione attuale

Diversi gruppi di esperti in parassitologia (Resfiz, Leishvet...) si trovano d'accordo sulla necessità di un'individuazione sierologica regolare per la leishmaniosi, soprattutto nelle zone endemiche in cui il numero di animali portatori asintomatici è importante¹. Relativamente alla leishmaniosi, il metodo di riferimento è l'immunofluorescenza indiretta (IFAT)²: essa permette di evidenziare e quantificare gli anticorpi anti *Leishmania infantum*; tuttavia, poiché questa tecnica può essere realizzata solo in laboratorio, è poco adatta alla pratica clinica quotidiana. L'uso di test rapidi affidabili permette, in prima intenzione, di determinare lo status sierologico dell'animale, direttamente in ambulatorio. Un risultato negativo permette di escludere la leishmaniosi, mentre un risultato positivo può essere confermato e quantificato mediante l'IFAT.

K, come kinesine

Fortemente implicate nel metabolismo cellulare (trasporto di proteine, divisione cellulare), le kinesine sono particolarmente presenti nelle leishmanie in moltiplicazione nei tessuti e nei macrofagi. Le proprietà antigeniche delle kinesine sono note agli specialisti, tra cui i membri del gruppo Leishvet, e offrono alla sierologia per la leishmaniosi performance ottimali, sia per quanto riguarda la specificità che per la sensibilità³.

Allo scopo di proporre un test per l'individuazione della leishmaniosi affidabile in

ogni situazione sierologica, BVT, filiale diagnostica del gruppo Virbac, ha sviluppato il test Speed Leish K, test sierologico rapido di nuova generazione.

L'innovazione tecnologica di Speed Leish K risiede nel rilevamento degli anticorpi anti-kinesine di *Leishmania infantum* grazie all'impiego di proteine ricombinanti altamente purificate: il complesso di kinesine di cattura. Questo complesso è formato da diverse kinesine specifiche di *Leishmania*, selezionate per il loro forte potere immunogeno, che permette un'evidenziazione sin dai primi stadi e lungo tutto il corso dell'infestazione parassitaria.

Performance paragonabili a quelle del metodo di riferimento

Le performance di Speed Leish K sono state valutate in modo indipendente dall'Unità di Parassitologia dell'Ecole Nationale Vétérinaire di Lione, sotto la responsabilità del prof. Bourdoiseau⁴. Un campione di 122 sieri provenienti da zone di enzoozia e da zone indenni hanno permesso di confrontare le performance di Speed Leish K con i risultati ottenuti tramite IFAT. Questi risultati mostrano che Speed Leish K ha una specificità del 100% e una sensibilità del 98% sul campione testato. Gli autori di questo studio concludono che i risultati di Speed Leish K concordano per il 98,5% con i risultati dell'IFAT e che, grazie a



queste performance ottimali, Speed Leish K rappresenta il primo passo per determinare in modo affidabile lo status dell'animale nei confronti della leishmaniosi, sia per lo screening dei cani sani che, a scopo diagnostico, nei cani che presentano sintomi clinici suggestivi di leishmaniosi.

Un test adatto all'uso in clinica

Speed Leish K è un test immunocromatografico rapido che permette di determinare lo status sierologico di un cane nei confronti della leishmaniosi, con una sola goccia di siero, plasma o sangue intero. Speed Leish K è un test di screening specifico per gli anticorpi anti-kinesine di *Leishmania infantum*, mediante il complesso di kinesine di cattura. Questa tecnologia offre diversi vantaggi pratici:

- l'utilizzo di Speed Leish K è molto semplice: deposizione del campione e poi del reagente, senza tappe intermedie;
- la procedura di Speed Leish K è rapida: i risultati si ottengono in 20 minuti;
- Speed Leish K è disponibile in 2 tipologie di confezioni: kit da 6 e 20 test;
- Speed Leish K è anche associato a un test sierologico per l'ehrlichiosi nel test Speed Duo Leish K/Ehrli e per la dirofilariosi nel test Speed Duo Diro/Leish K, entrambi commercializzati in kit da 6 e 20 test.
- Speed Leish K, Speed Duo Leish K/Ehrli e Speed Duo Diro/Leish K si conservano a temperatura ambiente per 24 mesi.

Bibliografia

1. Solano-Gallego I., Koutinas A., Miro G. e coll - Direction for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, 2009; 165: 1-18.
2. Maia C., Campino L. - Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.*, 2008; 158: 274-287.
3. Boarino A., Scalone A., Gradoni L., Ferroglio E. e coll - Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12(5):647-653.
4. Chene J., Bourdoiseau G., Chabanne L. et al - Comparison of a rapid immunochromatographic test with immunofluorescence assay for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in dog. 2nd Congresso Internazionale Scivac - Leishmaniosi canina. Pisa, Italia, aprile 2010.

■ CaniLeish[®]: produzione Un processo di fabbricazione unico



“Virbac ha raccolto una vera e propria sfida in termini di produzione e optato per una tecnica di fabbricazione inedita”.

Jean-Louis Belmon
Responsabile produzione leishmaniosi
Gruppo Virbac

“**P**rimo vaccino registrato in Europa contro la leishmaniosi canina, CaniLeish[®] rappresenta un'innovazione R&D. Oltre all'ottenimento di un'AIC europea, il 14 marzo 2011, Virbac ha raccolto una vera e propria sfida in termini di produzione, e optato per una tecnica di fabbricazione inedita.

In cosa è originale il processo di produzione di CaniLeish[®]?

Al di là della performance rappresentata dall'immissione sul mercato del primo vaccino antiparassitario in Europa diretto contro *Leishmania infantum*, il carattere innovativo della sua produzione si esprime a più livelli: innanzitutto per la modalità di coltura senza siero e senza cellule del parassita, processo di fabbricazione derivato da una collaborazione tra l'IRD di Montpellier e BVT, che ha fatto in modo che si potesse realizzare un sistema di produzione esclusivo. Per la produzione su scala industriale di CaniLeish[®], infatti, Virbac si è dotata di quella che probabilmente è in Europa la prima unità specializzata in biotecnologie, che si basa sul concetto di bioreattori monouso.

Questa tecnica d'avanguardia è spesso utilizzata in fase di sviluppo o pre-sviluppo, molto più raramente in fase di produzione industriale. Al posto dei convenzionali serbatoi in acciaio, la zona di produzione prevede tre bioreattori monouso da 50 litri per la produzione dell'*inoculum*, e altri tre da 1.000 litri per la coltura del parassita. Per raggiungere la capacità di produzione prevista, abbiamo creato una nuova unità da 500 m², e reclutato una equipe specializzata e dedicata alla produzione di CaniLeish[®].

Quali sono i vantaggi?

L'impiego di bioreattori monouso ha permesso di mettere in servizio la nuova unità

di produzione soltanto otto mesi dopo l'inizio dei lavori. Il metodo funziona in *batch* (a sistema chiuso), senza contatto tra il prodotto e l'atmosfera: le connessioni o deconnessioni a settiche dei condotti di trasferimento vengono effettuate mediante un processo di termosaldatura, che rende inutile la sterilizzazione con il vapore e la pulizia dopo l'uso.

In sintesi: un risparmio di tempo e una maggior facilità di utilizzo, perché questo metodo consente di adattare la capacità produttiva alla domanda.

Quale incidenza sulla qualità del prodotto?

CaniLeish[®], vaccino ottenuto tramite biotecnologia, presenta vantaggi quali la sicurezza d'impiego e la quasi perfetta definizione dell'antigene utilizzato per la vaccinazione. Le modalità di produzione del principio attivo prevedono cinque settimane di amplificazione del parassita, seguite da diverse tappe di purificazione. Durante la fase di amplificazione, l'impiego di bioreattori monouso consente lo sviluppo dei parassiti in condizioni ottimali di coltura. Al termine della coltura di produzione in bioreattori da 1.000 litri, i parassiti vengono eliminati



dalla coltura mediante microfiltrazione tangenziale su membrana da 0,22 μm. Successivamente si effettua una tappa di ultrafiltrazione tangenziale il cui scopo è quello di concentrare le proteine secrete dal parassita nel surnatante raccolto, poi una tappa di filtrazione sterilizzante del principio attivo.

Il principio attivo ottenuto viene poi criocongelato per essere conservato. La successione delle due tappe di filtrazione tangenziale per la purificazione del principio attivo assicura la qualità e la purezza ottimale del vaccino.



Nicolas Saez
Responsabile
produzione vaccini
Gruppo Virbac

Tappe finali del condizionamento

“Il principio attivo viene suddiviso sterilmente nei flaconi mediante una linea automatizzata (macchina per lavare i flaconi, tunnel di sterilizzazione, riempitrice). Al termine del riempimento, i flaconi vengono liofilizzati, prima di essere sigillati con una capsula. Il vaccino semi-finito viene conservato in camera fredda per tutta la durata dei controlli. Il condizionamento secondario dei vaccini viene effettuato su un'altra linea automatizzata (etichettatura dei flaconi, associazione con il diluente in monodose, aggiunta del foglietto illustrativo...). Anche il prodotto finito viene stoccato in camera fredda, fino a quando il Controllo Qualità dà il via libera al lotto. A questo punto, il lotto può essere spedito e commercializzato”.

■ CaniLeish[®]: studi di efficacia

Un livello di protezione dimostrato sul campo



“Lo studio ha lo scopo di validare l’efficacia del vaccino, in località scelte per essere rappresentative delle condizioni più estreme possibili che un cane possa incontrare in una zona endemica per la leishmaniosi canina in Europa”.

Nicoletta Rizzi, DVM
Technical Service
Virbac Italia

“U no studio in cieco è stato condotto presso due strutture selezionate a partire dai dati epidemiologici di prevalenza della malattia: una ubicata vicino a Napoli, in Italia, e una vicino a Barcellona, in Spagna. Alla fine dei due anni dello studio, nel gruppo controllo il 23% dei cani presentava una malattia sintomatica, mentre l’incidenza della malattia nelle zone endemiche, calcolata in tutta l’Europa del sud è stimata nell’ordine del 10% per tutta la durata della vita di un cane!

Condizioni estreme

Ottanta cani in buona salute e negativi per *Leishmania infantum* sono stati inseriti nello studio: 41 vaccinati e 39 controlli. Gli animali vaccinati con CaniLeish[®] hanno ricevuto il protocollo classico: tre iniezioni a tre settimane di intervallo come prima vaccinazione, seguita da un richiamo annuale. Questi cani hanno soggiornato in quella località per due anni: da giugno-luglio 2007 a giugno-luglio 2009, periodo che corrisponde a due stagioni complete di attività del flebotomo. I cani non hanno ricevuto alcun antiparassitario esterno ad azione repellente, erano ospitati in modo continuativo - notte e giorno - in canili aperti; inoltre non è stata messa in atto alcuna misura ambientale di lotta agli insetti.

Sistema di classificazione di riferimento

Il follow up dei cani è stato rigoroso: ogni tre mesi è stato effettuato: un esame clinico completo, esame sierologico (IFAT), esami ematologici e biochimici, mentre ogni sei mesi è stata eseguita una coltura parassitaria e una PCR a partire da agoaspirati linfonodali o di midollo osseo.

In base ai risultati dell’esame clinico e degli esami complementari, lo status dei cani ri-

spetto all’infestazione da *Leishmania infantum* è stato definito secondo un sistema di classificazione derivato da diverse pubblicazioni di riferimento:

- i cani qualificati come *sintomatici* sono quelli che presentano almeno un segno clinico che può far sospettare la leishmaniosi e più di due risultati ematobiochimici anomali compatibili, oppure quelli che non manifestano alcun segno clinico che può far pensare alla leishmaniosi ma più di tre risultati ematobiochimici anomali compatibili;
- i cani qualificati con lo status di *infezione attiva* sono quelli che presentano una coltura parassitaria positiva, indipendentemente dal fatto che siano sintomatici o meno,
- i cani semplicemente positivi in base alla PCR ma che non hanno nessun altro risultato di analisi positivo sono considerati come *subpatenti*: ciò significa che il DNA del parassita è stato rilevato nel corpo dell’animale, ma tenuto conto dell’estrema sensibilità della metodica PCR, si può trattare di parassiti vivi quiescenti o di frammenti di parassiti morti.

Il 93% dei cani vaccinati senza sintomi

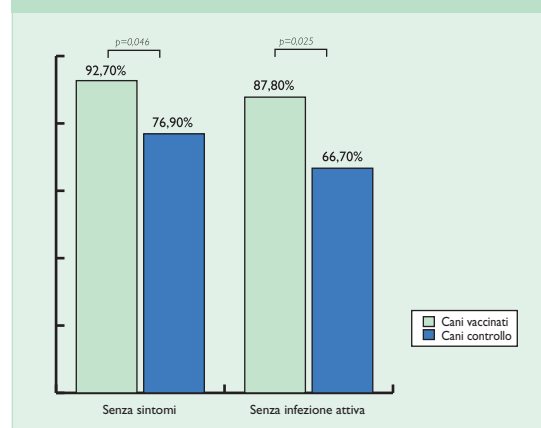
Dopo due anni di un *challenge* naturale intenso, una riduzione significativa del numero di animali sintomatici è stata ottenuta con il vaccino. È da sottolineare che, in simili condizioni di infestazione, quasi il 93% degli animali vaccinati è rimasto libero da qualsiasi sintomo della malattia.

In questo studio, la vaccinazione con CaniLeish[®] ha permesso di diminuire significativamente il rischio che un cane svilupasse un’infezione attiva e i sintomi della malattia.

Riduzione del rischio di 4 volte

Le *odds* sono misure che esprimono il rischio comparato che avvenga un evento. Si calcolano in ogni gruppo a partire dal rapporto tra la probabilità che si verifichi un evento e la probabilità che lo stesso non si verifichi. Il rapporto delle quote (o *odd ratio*) tra i gruppi vaccinati e quelli di controllo permette di stimare il rischio relativo. Per il verificarsi dell’infezione attiva, l’*odd ratio* è di 1/3,6. Per il verificarsi della malattia sintomatica, l’*odd ratio* è di 1/3,8. Dunque, la vaccinazione riduce di quattro volte il rischio di sviluppare la malattia. I risultati confermano anche le condizioni estreme di questo studio. Nonostante le condizioni estreme dello studio, la vaccinazione con CaniLeish[®] ha prodotto un beneficio significativo. Grazie alla sua azione sul sistema immunitario dei cani esposti ai parassiti, CaniLeish[®] ha ridotto di 4 volte il rischio di sviluppare la leishmaniosi.

Schema: i risultati dello studio



■ CaniLeish[®]: studi di tolleranza Un buon profilo di sicurezza



“La sicurezza di impiego del vaccino CaniLeish[®] è legata prima di tutto alla sua composizione”.

Nicoletta Rizzi, DVM
Technical Service
Virbac Italia

La sicurezza di impiego di CaniLeish[®] è legata, innanzitutto, alla sua composizione:

- antigeni: soluzione purificata contenente unicamente le ESP (*Excreted Secreted Protein*),
- adiuvante: il QA-21 è una frazione purificata della saponina Quil-A. Questo adiuvante è ben noto a Virbac, che lo impiega già nel vaccino Leucogen[®], da diversi anni. Questa formulazione permette di diminuire il rischio di alcune reazioni secondarie avverse quali:
 - rischio di shock allergico: assenza di proteine diverse dalle ESP nel vaccino. Il terreno di coltura delle leishmanie non comporta la presenza di alcuna proteina o cellula che non siano quelle provenienti dalle leishmanie stesse;
 - rischio di rivirulentazione: assenza di rischio, perché nel vaccino il parassita non è presente; sono presenti solo le ESP provenienti dalle leishmanie.

Studio di campo - veterinari

Protocollo:

- **90 cani di età superiore ai 6 mesi: 28 località in Francia;**
 - **razze miste, nessuna razza rappresentava più dell'8% dei cani inseriti nello studio;**
 - **primo intervento vaccinale con 3 iniezioni;**
 - **disinfezione del sito di iniezione con alcool, massaggio post iniezione.**
- Follow up veterinario:**
- **esame veterinario completo ai giorni 0,**

0+4h, 2, 7, 14 e 21, dopo ogni iniezione; - stato generale, appetito, esame clinico completo, esame del sito di iniezione.

Le reazioni generali e locali sono state annotate dai veterinari al momento del follow up ravvicinato degli animali vaccinati.

- Reazioni generali (vedere tabella 1): in media, questo tipo di reazioni viene rilevato nel 15-20% dei casi in occasione della prima vaccinazione. Le reazioni generali osservate sono state principalmente: apatia, riduzione dell'appetito, ipertermia, diarrea, vomito.

Tutti i segni clinici osservati entro i 14 giorni seguenti a ogni somministrazione del vaccino sono stati registrati nello studio.

Non è stata osservata alcuna reazione grave.

- Reazioni locali (vedere tabella 1): in media, questo tipo di reazione viene osservato in circa il 25% dei casi in occasione della prima vaccinazione (1 cane su 4).

Le reazioni locali notate sono state principalmente: edema, dolore a livello del sito di iniezione, eritema, formazione di noduli, adenopatia.

Studio di campo - proprietari

Protocollo:

- **231 cani: 115 maschi, 116 femmine, 36 località;**
- **età da 5,5 mesi a 12 anni;**
- **il 27% dell'età di circa 6 mesi;**
- **razze miste, nessuna razza rappresentava più del 4,2% dei cani inseriti nello studio;**

Tabella 2: segni rilevati dai proprietari

- Totale: 9,1% delle reazioni vaccinali
- 6,1% di reazioni generali
 - di cui principalmente 2,2% di letargia transitoria
- 3,5% di reazioni locali segnalate dai proprietari

• primo intervento vaccinale con 3 iniezioni;

- **animali correttamente vaccinati con CHPPi/L, almeno due settimane prima;**
- **disinfezione del sito di iniezione con alcool, massaggio post iniezione autorizzato.**

Esame quotidiano del cane demandato al proprietario, con esame del sito di iniezione. Il proprietario doveva segnalare al veterinario qualsiasi anomalia evidenziata nell'arco dei 15 giorni successivi a ogni inoculazione della prima vaccinazione e portare l'animale in visita.

Il numero di reazioni rilevate dai proprietari è di gran lunga minore di quello osservato dai veterinari, il che testimonia la possibile presenza di reazioni che non rivestono carattere di gravità per il proprietario o che vengono considerate come normali dopo una vaccinazione e, di conseguenza, non vengono segnalate al veterinario curante. Il numero totale di reazioni secondarie probabili o possibili (secondo i criteri utilizzati nella farmacovigilanza) è del 9,1%, così suddiviso: 6,1% di reazioni generali e 3,5% di reazioni locali (vedere tabella 2). La somma delle reazioni locali più quelle generali non è pari al totale di 9,1%, perché alcuni animali possono aver manifestato contemporaneamente una reazione locale e una generale in occasione della prima vaccinazione. In definitiva, il vaccino CaniLeish[®] presenta un buon profilo di sicurezza. Tenuto conto della possibile presenza di reazioni locali quali edema al punto di inoculo o reazioni generali quali apatia, raccomandiamo ai veterinari di avvertire i proprietari di animali che queste reazioni sono state descritte e sono possibili e benigne, dopo il primo intervento vaccinale con CaniLeish[®].

Tabella 1: segni rilevati dai veterinari

POSSIBILI REAZIONI GENERALI			POSSIBILI REAZIONI LOCALI		
Segni generali	iniezione	%	Segni locali	iniezione	%
Apatia, riduzione dell'appetito, diarrea, vomito, ipertermia...	1°	17,8	Edema, dolore a livello del sito di iniezione, eritema, noduli, adenopatia	1°	24,4
	2°	14,6		2°	27
	3°	20,2		3°	23,6

■ CaniLeish[®]: protocollo vaccinale

Tre iniezioni, a tre settimane di intervallo, a partire dai sei mesi



“CaniLeish[®] permette l’immunizzazione attiva nei confronti dei cani negativi alla leishmaniosi a partire dall’età di sei mesi per ridurre il rischio di sviluppare un’infezione attiva e una malattia dopo il contatto con *Leishmania infantum*.”

Anna Rondolotti, DVM
Marketing Manager animali da compagnia
Virbac Italia

“La prima vaccinazione consiste in tre iniezioni, effettuate a distanza di tre settimane l’una dall’altra, a partire all’età di sei mesi. L’immunità si instaura quattro settimane dopo l’ultima somministrazione del primo ciclo vaccinale e la durata è di un anno, sempre a partire dall’ultima somministrazione. In assenza di studi specifici, la somministrazione di CaniLeish[®] assieme ad altri farmaci deve essere decisa caso per caso, valutando il rapporto rischio/beneficio. Noi raccomandiamo un intervallo minimo di due settimane tra la somministrazione di CaniLeish[®] e quella di altri vaccini.

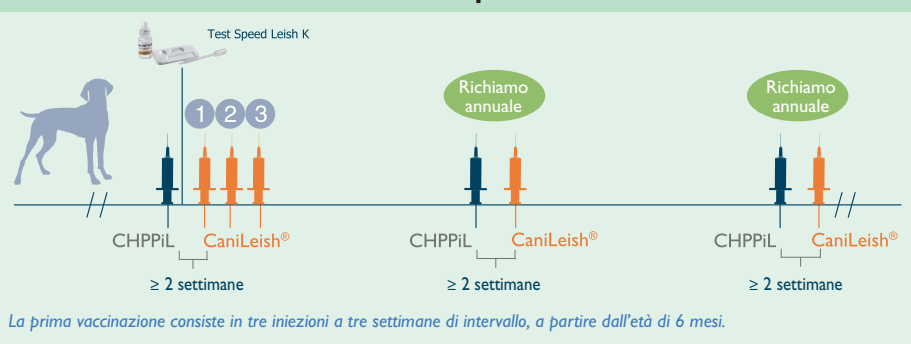
Individuare i cani sieronegativi

È necessario verificare che i cani siano sieronegativi per la leishmaniosi prima di intraprendere la vaccinazione con CaniLeish[®]: tutti gli esami complementari specifici utili a evidenziare la presenza di leishmanie possono essere utilizzati, ma è necessario conoscere i limiti tecnici di ciascun esame.

I test sierologici rapidi hanno il vantaggio di esser di facile uso, e di permettere di ottenere i risultati immediatamente. Ovviamente, bisogna scegliere test che abbiano una eccellente concordanza con l’immunofluorescenza indiretta (IFAT) quantitativa (metodo di riferimento). Il test Speed Leish KTM proposto da BVT ha una concordanza del 98,5% con l’IFAT¹ (leggere a pag. 11: test Speed Leish KTM).

- Se il test rapido è negativo, la vaccinazione può essere effettuata.
- Se il test rapido è positivo, va invece effettuata una sierologia quantitativa.
- Se la sierologia quantitativa è negativa, il cane può essere vaccinato.
- Se la sierologia quantitativa è debolmente positiva (cioè tra la soglia fissata dal laboratorio e 4 volte la soglia di positività del laboratorio), lo status dell’animale è dubbio: bisogna seguire attentamente il cane e ripetere la sierologia

Schema 1: vaccinazione di un cane di più di 6 mesi



dopo tre mesi. È anche possibile eseguire altri esami specifici per la ricerca delle leishmanie.

- Se la sierologia quantitativa è fortemente positiva (cioè oltre 4 volte la soglia di positività del laboratorio), il cane è in fase di infezione attiva e bisogna considerare la possibilità di sottoporlo a trattamento.

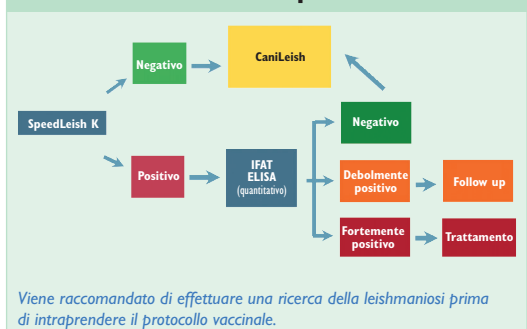
Buone pratiche di vaccinazione

Come per qualsiasi altra vaccinazione, il cane deve essere in buona salute. Prima della vaccinazione il cane va sottoposto a trattamento antiparassitario, non solo per migliorare il suo stato generale ma anche per facilitare la risposta immunitaria Th1 post vaccinale. Il vaccino deve essere conservato in frigorifero e ricostituito immediatamente prima dell’uso. Prima della somministrazione si consiglia di portare il vaccino a una temperatura prossima a quella corporea riscaldandolo con le mani, una volta iniettato si consiglia di massaggiare delicatamente il sito di inoculo.

Bibliografia

1. Chene J., Bourdoiseau G., Chabanne L. et al - Comparison of a rapid immunochromatographic test with immunofluorescence assay for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in dog. 2nd Congresso Internazionale Scivac - Leishmaniosi canina. Pisa, Italia, aprile 2010.

Schema 2: individuare prima di vaccinare



Distinguere il cane malato da quello vaccinato

Dopo la vaccinazione, possono apparire transitoriamente (fino a 4 mesi dopo la vaccinazione) degli anticorpi diretti contro il parassita *Leishmania* rilevabili da un test IFAT. Gli anticorpi temporanei indotti dalla vaccinazione possono essere differenziati da quelli prodotti nel corso di un’infezione naturale usando il test sierologico rapido Speed Leish KTM, come prima tappa del processo diagnostico.

CaniLeish®

Confrontarsi con il proprietario



Il vaccino CaniLeish® ha introdotto un innovativo sistema di prevenzione nei confronti della leishmaniosi canina

Marco Maggi DMV
Libero Professionista, Voghera.

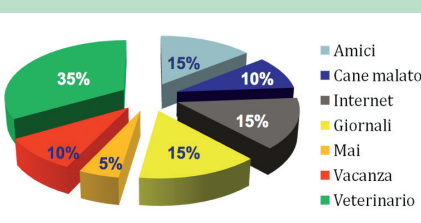
Il 2012 si è aperto con un'importante opportunità per la classe veterinaria, a dimostrazione di come la ricerca tecnologica Virbac sia leader mondiale nella prevenzione vaccinale. Come titolare di un ambulatorio, vorrei però affrontare la questione "vaccino" da un punto di vista più gestionale.

I vaccini, o più in generale, le profilassi, sono da sempre pilastro imprescindibile nell'organizzazione di una struttura veterinaria. In futuro la situazione potrà forse anche cambiare, ma oggi qualunque ambulatorio, utilizza le profilassi come leva primaria per il contatto diretto con il paziente e il suo proprietario.

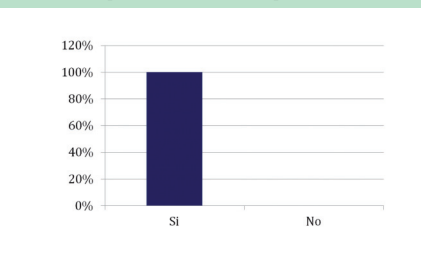
In collaborazione con il mio staff, abbiamo quindi scelto, per il nostro progetto, un approccio pragmatico, cercando di comprendere nella realtà quale fosse la percezione del proprietario al fine di decidere dove, come e quando utilizzare il vaccino CaniLeish. Sarebbero molte le domande da porre ai clienti, le cui risposte riteniamo interessanti per un corretto posizionamento del vaccino nella nostra struttura. Dobbiamo però, nella raccolta delle informazioni, considerare i mezzi a nostra disposizione (tempo, personale e budget) per organizzare azioni che siano utili e al tempo stesso sostenibili.

Nelle prossime righe vorremmo condividere con voi le nostre scelte e i nostri risultati. Sono stati selezionati 350 proprietari di cani considerando l'età del paziente (da 1 a 10 anni) e l'area abitata, scegliendo quelle zone non ancora endemiche, ma con casi segnalati di leishmaniosi. A questi proprietari è stato inviato un sms per annunciare l'arrivo del nuovo vaccino e la possibilità di ricevere direttamente in ambulatorio dai medici le corrette informazioni a riguardo. Ci siamo preparati ad accogliere i nostri

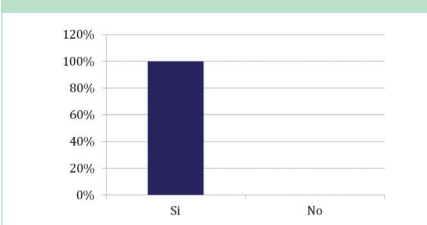
Domanda 1: Dove hai ricevuto le prime informazioni sulla leishmaniosi?



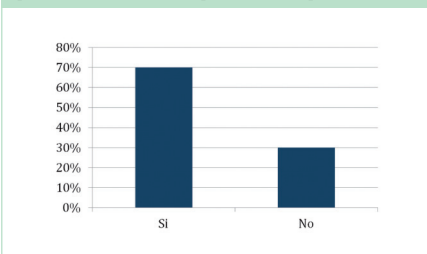
Domanda 3: Ritieni comunque utile la profilassi antiparassitaria?



Domanda 2: Ritieni necessaria la vaccinazione contro la leishmaniosi?



Domanda 4: Ritieni il costo della profilassi un aspetto importante?



clienti con il materiale informativo Virbac e un questionario di quattro domande (vedere figure) preparate da noi e abbiamo stimato un tempo medio di 10 minuti sia per le spiegazioni che per il questionario.

Nei primi 7 giorni hanno risposto 30 persone, cioè l'8,6% del gruppo iniziale. Dopo 30 giorni il numero è salito a 93, pari a circa il 27%.

Nell'analisi dei risultati del questionario, abbiamo ritenuto rilevante la prima domanda che dimostra come per il proprietario noi veterinari rappresentiamo ancora la prima fonte di informazioni. E la quarta domanda che ha condizionato, e non poco, la nostra strategia sul prezzo.

A fine 2012 abbiamo vaccinato il 9% del totale dei nostri pazienti. In attesa di verificare nel 2013 gli esiti del lavoro svolto, come prima esperienza ci riteniamo molto soddisfatti.

- Abbiamo contribuito a un'informazione

deontologica, scientifica e allargata, indirizzando l'utenza verso la scelta più corretta (vaccino sì/vaccino no) evitando la "malinformazione" o l'utilizzo di fonti non accreditate. L'informazione corretta è stata la chiave strategica per raggiungere l'ottimo risultato del 9%, considerando che lavoriamo in zona non endemica.

- Abbiamo risposto ad un'esigenza di "salute pubblica".

- Abbiamo fidelizzato per il futuro una parte dei nostri clienti condividendo l'importante significato della profilassi.

- Abbiamo realizzato un incremento di 2,2 punti percentuali sul fatturato relativo al 2011.

Il vaccino per la leishmaniosi è oggi ciò che in passato sono stati quello per la gastroenterite e altre profilassi e cioè un'opportunità a sostegno dell'ormai inscindibile dualismo tra scientificità e organizzazione al servizio dei nostri clienti.