



Νέα εποχή για τον έλεγχο της λεισμανίασης του σκύλου

Milteforan® πόσιμο διάλυμα

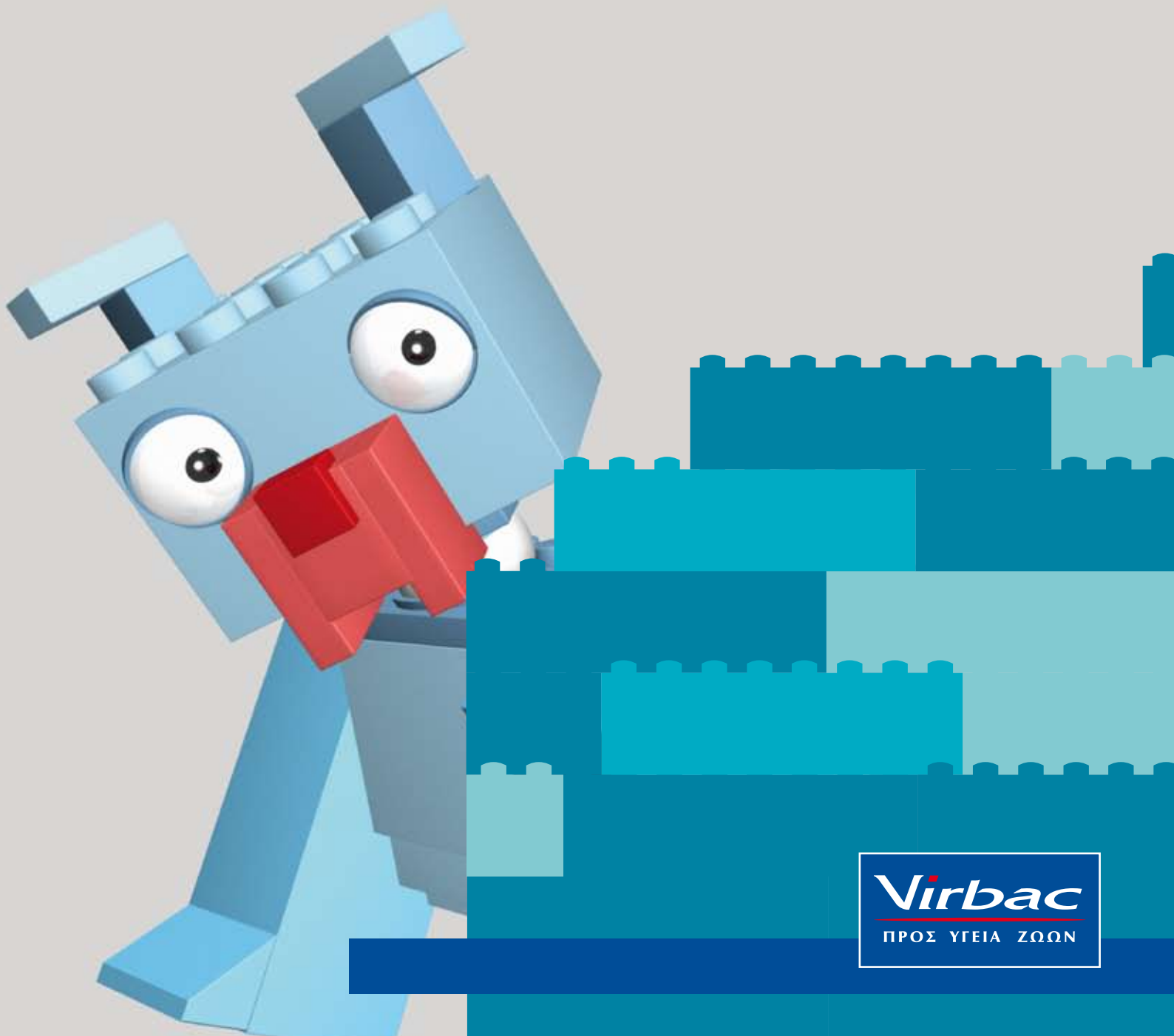
Virbac
ΠΡΟΣ ΥΓΕΙΑ ΖΩΩΝ

Virbac Hellas AE

23ο χλμ. Αθηνών - Λαμίας, 145 65 Άγιος Στέφανος, Αττική, Τηλ.: 210 6219520, Fax: 210 8140900
E-mail: info@virbac.gr, Site: www.virbac.gr

Νέα εποχή για τον έλεγχο της λεισμανίασης του σκύλου

Milteforan® πόσιμο διάλυμα



Περιεχόμενα

Milteforan®: Βασικές ιδιότητες και πλεονεκτήματα	2
1. Λεϊσμανίαση του σκύλου ΛΣ	3
1.1. Εισαγωγή	3
1.2. Επιδημιολογία της ΛΣ	4
1.3. Αιτιοπαθογένεια και κλινική εικόνα της ΛΣ	6
1.4. Περιορισμοί των προηγούμενων σχημάτων ελέγχου της ΛΣ	8
2. Milteforan®: ένα καινοτόμο φάρμακο στην κτηνιατρική	9
2.1. Ιστορία της милτεφοσίνης	9
2.2. Παρασιτοκτόνες ιδιότητες κατά της <i>Leishmania</i>	9
2.3. Φαρμακοκινητική της милτεφοσίνης	12
2.4. Ατοξικό για τους ιστούς - στόχους	14
3. Milteforan®: Αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια σε κλινικές μελέτες στην κτηνιατρική πράξη	17
3.1. Σημαντική βελτίωση της κλινικής εικόνας των σκύλων που νοσούν από λεϊσμανίαση	17
3.2. Αποδεδειγμένη ασφάλεια στη συνιστώμενη δόση	24
3.3. Ασφαλές και αποτελεσματικό σε συνδυασμό με αλλοπουρινόλη	25
4. Milteforan®: Εύκολη και άνετη χορήγηση από τον ιδιοκτήτη	29
4.1. Ευκολία στη χορήγηση	29
4.2. Χαρακτηριστικά του προϊόντος	29
4.3. Ασφάλεια για τον ιδιοκτήτη του σκύλου που το χορηγεί	31
5. Milteforan®: Συμπεράσματα	33
Βιβλιογραφία	34

Milteforan®: Βασικές ιδιότητες και πλεονεκτήματα
Η νέα γενιά φαρμάκων για τον έλεγχο της λεισμανίασης του σκύλου

NEO: ένα καινοτόμο φάρμακο στην κτηνιατρική

- Πρωτοποριακός τρόπος δράσης κατά της *Leishmania*
- Δεν εξαρτάται από τη λειτουργικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος

NEO: Αυξημένη συμμόρφωση του ιδιοκτήτη

- Πόσιμο διάλυμα για χορήγηση από το στόμα μία φορά την ημέρα
- Όχι επώδυνες ενέσεις
- Ευκολία στη χορήγηση με την τροφή από τον ιδιοκτήτη

Αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια για όλους τους σκύλους με λεισμανίαση

- Σημαντική κλινική και παρασιτολογική αποτελεσματικότητα
- Δεν προκαλεί βλάβη στους νεφρούς
- Δεν αντενδείκνυται σε σκύλους με νεφρική νόσο

***Milteforan® προσφέρει την ευελιξία ενός καινοτόμου
πόσιμου διαλύματος για τον έλεγχο της λεισμανίασης
μίας σοβαρής χρόνιας νόσου του σκύλου***

1. Λεϊσμανίαση του σκύλου ΛΣ

1.1. Εισαγωγή

Η λεϊσμανίαση προσβάλλει ανθρώπους καθώς και άγρια και κατοικίδια ζώα σε όλες τις εύκρατες, υποτροπικές και τροπικές περιοχές του κόσμου.

Η λεϊσμανίαση του σκύλου (ΛΣ) είναι μία σοβαρή και θανατηφόρα νόσος στις παραμεσόγειες χώρες στην Ευρώπη. Είναι μία λοιμώδης νόσος που προκαλείται από διάφορα είδη μαστιγοφόρων πρωτοζώων παρασίτων τα οποία ανήκουν στο γένος *Leishmania*, της τάξης *Kinetoplastida*. Αυτά τα παράσιτα μολύνουν διάφορα είδη σπονδυλωτών ζώων, όπως τρωκτικά, σκύλους και ανθρώπους και μεταδίδονται με το τσίμπημα σκνίπας (του γένους *Phlebotomus* στον Παλαιό Κόσμο). Η σκνίπα είναι ο ενδιάμεσος ξενιστής της νόσου, μεταδίδει το παράσιτο όταν απομυζά το αίμα από τον ξενιστή. Η λεϊσμανίαση είναι μία ζωοανθρωπονόσος και οι σκύλοι θεωρούνται ότι αποτελούν την κύρια δεξαμενή του παρασίτου.

Η λεϊσμανίαση του ανθρώπου είναι ενδημική σε 88 χώρες σε 4 ηπείρους (Νότια Ευρώπη, ορισμένες περιοχές της Αφρικής, Ασία και Λατινική Αμερική). Σήμερα υπολογίζεται ότι πάσχουν από λεϊσμανίαση 10-15 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Υπάρχουν 1.5 έως 2 εκατομμύρια νέα κρούσματα ετησίως, ενώ 350 εκατομμύρια άνθρωποι αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο να νοσήσουν.⁴¹

Η λεϊσμανίαση του ανθρώπου είναι μία σύνθετη και ευρέως διαδεδομένη νόσος που έχει διάφορες κλινικές μορφές. Οι άνθρωποι είναι συνήθως ασυμπτωματικοί φορείς της *Leishmania*, αλλά η νόσος μπορεί να εμφανιστεί ως δερματική λεϊσμανίαση (η οποία μπορεί να παρουσιαστεί και ως βλεννογονοδερματική μορφή) ή σπλαχνική λεϊσμανίαση.

Γεωγραφική κατανομή της σπλαχνικής λεϊσμανίασης στον άνθρωπο



Η λεϊσμανίαση του σκύλου στις παραμεσόγειες χώρες προκαλείται από τη *Leishmania infantum* (στην Ελλάδα υπάρχουν επίσης εστίες της *Leishmania tropica*).

Ονοματολογία

- *Leishmania infantum* ανήκει στο σύμπλεγμα της *Leishmania donovani*. Περιστασιακά αναφέρεται λανθασμένα ως *Leishmania donovani*.
- *Leishmania chagasi* αναφέρεται στο παράσιτο που προκαλεί τη λεϊσμανίαση του σκύλου στη Νότια Αμερική
- Η *Leishmania infantum* και η *Leishmania chagasi* είναι ταυτόσημες. Το όνομα *L. infantum* θα πρέπει να αντικαταστήσει το όνομα *L. chagasi*.

1.2. Επιδημιολογία της ΛΣ

Μελέτες για τους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τη ΛΣ έχουν δείξει ότι στις ενδημικές περιοχές:³¹

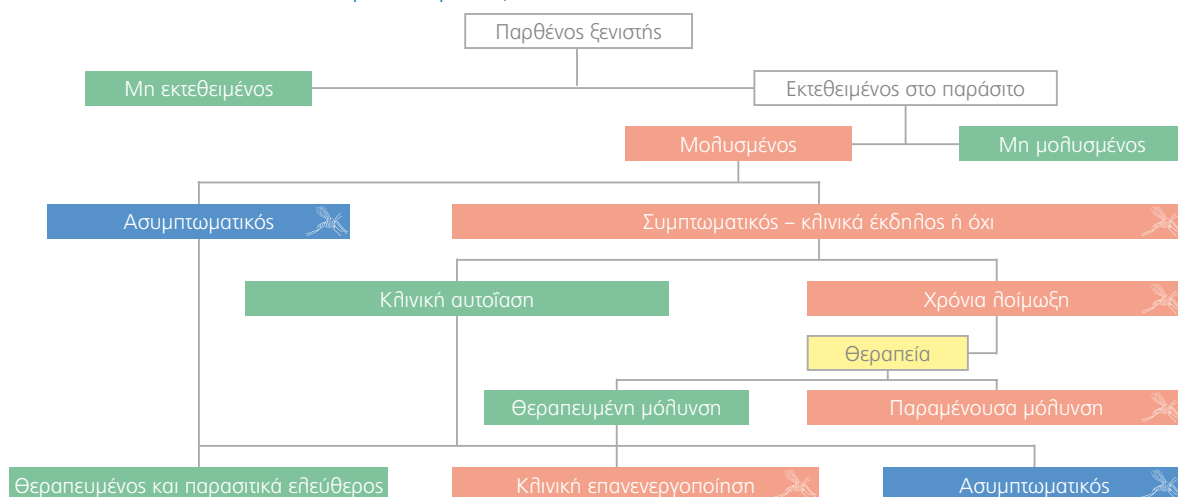
- Το φύλο δεν φαίνεται να είναι ένας παράγοντας κινδύνου
- Όλες οι φυλές είναι ευαίσθητες
- Ο επιπολασμός της ΛΣ αυξάνει μέχρι την ηλικία των 3 ετών, στη συνέχεια μειώνεται μέχρι την ηλικία των 7-8 ετών, όπου παρατηρείται μία δεύτερη έξαρση
- Ο κίνδυνος σχετίζεται με τις δραστηριότητες του σκύλου (άγριοι, αγροτικοί και σκύλοι εργασίας έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να τσιμπηθούν από σκνίπες από εκείνους που ζουν στην πόλη)
- Η ανοσολογική αντίδραση κάθε σκύλου και η λοιμογόνος δύναμη του στελέχους της *L.infantum* παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο

Ο σκύλος θεωρείται ο πλέον ευαίσθητος κρίκος του βιολογικού κύκλου της *L.infantum*, αν και μόλυνση δεν σημαίνει απαραίτητα και ενεργή νόσος, ενώ μολυσμένοι σκύλοι από την ίδια ενδημική περιοχή μπορούν να αναπτύξουν διαφορετική κυτταρική ανοσία.

Η ανοσολογική κατάσταση του κάθε σκύλου προσδιορίζει το εάν θα εκδηλωθεί κλινική νόσος. Τα ζώα που αναπτύσσουν ισχυρή κυτταρική ανοσία (τα αποκαλούμενα τύπου Th1) απαλλάσσονται από το παράσιτο. Σε εκείνα με ασθενέστερη κυτταρική ανοσία, το παράσιτο αποικίζει και πολλαπλασιάζεται στα μακροφάγα και διασπείρεται στη συνέχεια στο μυελό των οστών, τα λεμφογάγγλια, το σπλήνα και το ήπαρ. Τα ζώα της τελευταίας αυτής ομάδας, συχνά αναπτύσσουν ισχυρή χυμική ανοσία (τα αποκαλούμενα τύπου Th-2) η οποία δε βοηθά στην εξόντωση του παρασίτου και προκαλεί βλάβες σε διάφορα όργανα του σώματος.³⁴

Εικόνα 1: Πιθανή έκβαση της μόλυνσης με *L.infantum* (Moreno and Alvar, 2002)³¹

Το σύμβολο της σκνίπας δείχνει καταστάσεις στις οποίες ο μολυσμένος σκύλος μπορεί να μεταδώσει τη *Leishmania* στο έντομο ενδιάμεσο ξενιστή



Κατανομή της Λείσμανιάσης του Σκύλου στην Ευρώπη μετά το 2000



Η ΛΣ είναι ενδημική σε 11 μεσογειακές χώρες: Πορτογαλία, Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία, Μάλτα, Κροατία, Βοσνία-Ερζεγοβίνη, Μαυροβούνιο, Αλβανία, Ελλάδα και Κύπρος. Εκτός των ενδημικών αυτών περιοχών τα περιστατικά είναι σποραδικά και γενικά παρατηρούνται σε σκύλους που έχουν ταξιδέψει σε ενδημική περιοχή της νόσου.

Ο επιπολασμός (IFA, ELISA) της *L. infantum* είναι παρόμοιος σε όλες τις μεσογειακές χώρες, κυμαίνοντας από 0 – 40% από περιοχή σε περιοχή και εξαρτάται από τις οικολογικές συνθήκες. Επανειλημμένες εξετάσεις σε ίδια ομάδα ζώων έχουν δείξει ότι μπορεί να παρατηρηθεί ευρεία διακύμανση του επιπολασμού ανάμεσα σε δύο ή περισσότερες εποχές ή ακόμη και μέσα στην ίδια εποχή του έτους.³⁶

Πορτογαλία

Η μόλυνση είναι σποραδική με ορισμένες πολύ ενεργές εστίες: Άλτο Ντούρο (9.4%-37.8%),^{8,9} η μητροπολιτική περιοχή της Λισσαβώνας (3.8%-10.9%) και η Αλγκάρβε (9.5%).⁴⁴

Ισπανία

Τα δεδομένα δείχνουν επιπολασμό από 1.6% στην Γαλλική έως 18% στην Καταλονία (5.2% η περιοχή της Βόρειας Μαδρίτης, 5.3%-12.1% στη Γρανάδα).^{40,43,45} Η βορειοδυτική Ισπανία έχει παραδοσιακά χαρακτηριστεί ελεύθερη από λεισμανίαση, αλλά το 2004 μία μελέτη έδειξε ότι ο επιπολασμός της *L.infantum* ήταν 3.7%.⁴ Μία πρόσφατη μελέτη σε 100 σκύλους στη νήσο Μαγιόρκα έδειξε επιπολασμό της τάξης του 26%.

Γαλλία

Η ΑΣ είναι ενδημική στη νότια Γαλλία, σε μία περιοχή που σχηματίζεται από ένα τρίγωνο με κορυφή τα τμήματα της Αρντέτσε και Δρόμη στο βορρά, με τη ακτή της Μεσογείου από την Ισπανία έως τα σύνορα με την Ιταλία να σχηματίζει τη βάση. Στη Κορσική, ο επιπολασμός της νόσου κυμαίνεται από 3.2% έως 26%.^{13,14}

Ιταλία

H ΑΣ είναι ενδημική στην Ιταλία, στις κεντρικές - νότιες περιοχές και κατά μήκος των ακτών του Τυρηνικού πελάγους. Για πολλά χρόνια, η ορολογική διερεύνηση έχει δείξει θετικότητα >30% σε αυτές τις περιοχές. Όμως τα τελευταία χρόνια, η επιδημιολογική κατανομή έχει αλλάξει και νέες προσβεβλημένες περιοχές συνηγορούν στο ότι τόσο οι ξενιστές *Phlebotomus* όσο και η νόσος εξαπλώνονται, πιθανόν λόγω κλιματικών αλλαγών. Πρόσφατα, νέες εστίες έχουν αναφερθεί σε πολλές περιοχές της βόρειας χώρας.^{7,17,18}

Ελλάδα

Πρόσφατα ακριβή στοιχεία για τον επιπολασμό και τη συχνότητα της ΛΣ στην Ελλάδα δεν είναι διαθέσιμα. Παρόλα αυτά, η διάγνωση της ΛΣ γίνεται αρκετά συχνά στην καθημερινή κλινική πράξη σε όλη τη χώρα και ιδιαίτερα στις περιοχές των Αθηνών, Θεσσαλονίκης, Κέρκυρας και Κρήτης (2.5% - 40%).^{23,38}

Κύπρος

Κατά τη διάρκεια μίας ορολογικής έρευνας το 1996, ο υψηλότερος επιπολασμός βρέθηκε στις περιοχές του Αγίου Γεωργίου (26.2%) και της Λιμνάτης (12.2%).

Μάλτα

Η ΛΣ είναι ενδημική στη Μάλτα με επιπολασμό που κυμαίνεται από 7% έως 17%.

Όλα αυτά τα ορολογικά δεδομένα συνηγορούν στο ότι από τους 15 εκατομμύρια σκύλους σε αυτές τις χώρες, με μία συντηρητική εκτίμηση τα 2.5 εκατομμύρια (16.7%) είναι μολυσμένοι.³¹

1.3. Αιτιοπαθογένεια και κλινική εικόνα της ΛΣ

Η *Leishmania* μεταδίδεται με τσίμπημα ορισμένων ειδών σκνιπών, που περιλαμβάνουν μύγες του γένους *Lutzomyia* στο Νέο Κόσμο και του γένους *Phlebotomus* στον Παλαιό Κόσμο.

Από τα 500 γνωστά είδη *Phlebotomus* μόνο 30 από αυτά έχουν απολύτως αναγνωριστεί ως ξενιστές της νόσου. Μόνο η θηλυκιά σκνίπα μεταδίδει τα πρωτόζωα, που με τη σειρά της μολύνεται με τα παράσιτα της *Leishmania* τα οποία περιέχονται στο αίμα που μυζά από τον άνθρωπο ή θηλαστικό ξενιστή. Για μία περίοδο που κυμαίνεται από 4 έως 25 ημέρες, το παράσιτο συνεχίζει την ανάπτυξή του μέσα στη σκνίπα όπου υφίσταται μία σημαντική μεταμόρφωση (βλ. Εικόνα 2).^{20,21}

Τα παράσιτα της *Leishmania* έχουν δύο μορφολογικά στάδια στο βιολογικό τους κύκλο:



Phlebotomus sp. sandfly

Το προμαστιγωτό

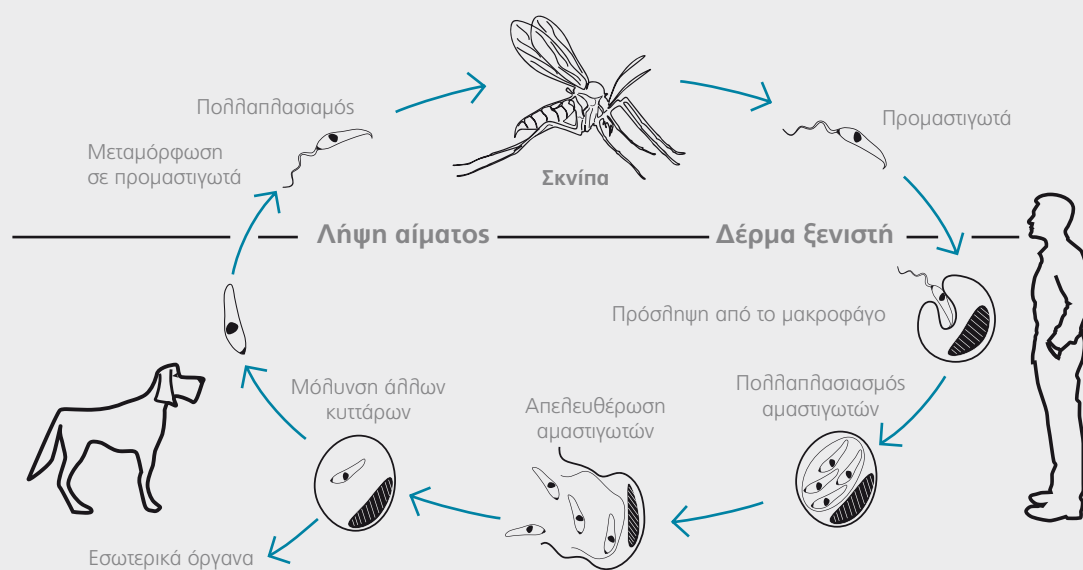
- Επιμήκης, κινητή, μαστιγοφόρα μορφή
- Αποικίζει το πεπτικό σύστημα της σκνίπας

Το αμαστιγωτό

- Στρογγύλη ή ωοειδής μορφή
- Βρίσκεται σε ορισμένα κύτταρα (π.χ. μακροφάγα) των σπονδυλωτών.

Οι σκνίπες ενοφθαλμίζουν τα μολυσματικά προμαστιγωτά κατά τη διάρκεια των γευμάτων αίματος. Εκείνα τα παράσιτα που φθάνουν στο χόριο φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα και μεταμορφώνονται σε αμαστιγωτά.

Τα αμαστιγωτά πολλαπλασιάζονται μέσα στα μολυσμένα κύτταρα και προσβάλλουν διαφορετικούς ιστούς. Οι σκνίπες μολύνονται κατά τη διάρκεια της λήψης αίματος από ένα μολυσμένο ξενιστή όταν προσλαμβάνουν μακροφάγα μολυσμένα με αμαστιγωτά. Στο έντερο της σκνίπας, τα παράσιτα διαφοροποιούνται σε προμαστιγωτά, τα οποία πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν στην προβοσκίδα του εντόμου. Από εκεί μπορούν να εισέλθουν σε ένα νέο σπονδυλωτό κατά τη διάρκεια της επόμενης λήψης αίματος της σκνίπας, ξεκινώντας έτσι μία νέα μόλυνση.^{20,21}

Εικόνα 2: Ο βιολογικός κύκλος της *Leishmania sp.* (τροποποιημένος από Roze, 2005)⁴²

Η κλινική εικόνα της ΛΣ εξαρτάται από το πιο όργανο προσβάλλεται, όπως είναι το δέρμα, τα νύχια, οι οφθαλμοί, οι μυς, το αίμα καθώς επίσης οι νεφροί και το ήπαρ. Τα συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν σε διάφορους συνδυασμούς και αλλάζουν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου. Η δερματική μπορεί να εξελιχθεί στη σπλαχνική μορφή και να καταλήξει ως γενικευμένη λεισμανίαση. Τα συχνότερα συμπτώματα περιλαμβάνουν:³¹

Σύμπτωμα	Συχνότητα
Λεμφαδενοπάθεια	93%
Δερματίτιδα	90%
Ονυχογρύπωση	75%
Αναιμία	50%
Απώλεια βάρους	26%
Καχεξία	24%
Κινητικά προβλήματα	23%
Επιπεφυκίτιδα	18%
Επίσταξη	9%
Υψηλή παραγωγή αντισωμάτων	
Καταστολή της κυτταρικής ανοσίας	

Η κλινική διάγνωση της ΛΣ είναι δύσκολη λόγω της ποικιλίας των συμπτωμάτων, τα οποία μοιάζουν με εκείνα άλλων νοσημάτων.

Οι διαγνωστικές δοκιμές που συχνά χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν την άμεση ανίχνευση του παρασίτου, τις έμμεσες ορολογικές μεθόδους και τις μοριακές τεχνικές με την PCR. Δυστυχώς, δεν υπάρχει μία 100% ειδική και ευαίσθητη διαγνωστική δοκιμή.

1.4. Περιορισμοί των προηγούμενων σχημάτων ελέγχου της ΛΣ

Η θεραπεία της ΛΣ είναι δύσκολη και η νόσος συχνά υποτροπιάζει. Η ενδοκυτταρική εντόπιση του παρασίτου και ο μεταβολισμός του το προστατεύει από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και από τα περισσότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της νόσου.

Στην κτηνιατρική, όπως και στην ιατρική, τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα φάρμακα είναι οι πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου που επιλεκτικά αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων του παρασίτου που είναι υπεύθυνα για τη γλυκόλυση και την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Το Glucantime® (Merial), ενέσιμο διάλυμα που βασίζεται στην αντιμονιούχο μεγλουμίνη, ήταν μέχρι τώρα το μόνο αναγνωρισμένο κτηνιατρικό προϊόν σε ορισμένες χώρες της Ευρώπης για τη θεραπεία της ΛΣ. Το προϊόν αυτό ποτέ δεν έλαβε άδεια κυκλοφορίας στην Ελλάδα.

Οι πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια και ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών της *Leishmania* στους σκύλους είναι υψηλός και αυξάνεται.¹⁹ Εικάζεται ότι το παράσιτο καθίσταται λιγότερο ευαίσθητο σε αυτό το συστατικό λόγω της ευρείας χρήσης του και των υπο-θεραπευτικών δόσεων που χορηγούνται θεραπευτικά για διάφορα χρόνια διαστήματα.

Η μη ορθή χρησιμοποίηση των αντιμονιούχων σχετίζεται με την ανάγκη για επανειλημμένες χορηγήσεις παρεντερικά, μία ή δύο φορές ημερησίως ή μέρα παρά μέρα. Οι ενέσεις μπορεί να δημιουργήσουν τοπικές αντιδράσεις, καθώς και άλλες παρενέργειες όπως γαστρεντερικά συμπτώματα, μυϊκό πόνο, νεφρίτιδα και ηπατίτιδα.^{5,35} Το Glucantime® αντενδείκνυται σε σκύλους με ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια.

Αν και δεν είναι αναγνωρισμένο ως κτηνιατρικό φάρμακο, η αλλοπουρινόλη χρησιμοποιείται επίσης συχνά στην κλινική πράξη. Η αλλοπουρινόλη είναι ένα ανάλογο της πουρίνης που ασκεί ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη της *Leishmania* μέσω εσφαλμένων πληροφοριών μετάφρασης για την πρωτεϊνική σύνθεση. Όμως, η δράση της είναι παρασιτοστατική και όχι παρασιτοκτόνα.

Η αλλοπουρινόλη συχνά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τις πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου στην αρχική φάση της θεραπείας και στη συνέχεια μόνη της ως θεραπεία συντήρησης για τον έλεγχο των υποτροπών. Αυτό συχνά απαιτεί τη δια βίου χορήγηση του φαρμάκου για να επιτευχθεί κλινική ίαση μετά τη θεραπεία.

*Με την αποδεδειγμένη του αποτελεσματικότητα και ασφάλεια
καθώς και την ευκολία στη χρήση του, το Milteforan®
θα καταστεί το προϊόν αναφοράς για τον έλεγχο της ΛΣ*

2. Milteforan®: ένα καινοτόμο φάρμακο στην κτηνιατρική

2.1. Ιστορία της μιλτεφοσίνης

Η μιλτεφοσίνη ανακαλύφθηκε στο Ινστιτούτο Max Planck στο Gottingen από τους καθηγητές Hans Eibl και Clemens Unger και εξελίχθηκε σε φάρμακο για τον άνθρωπο από την Aeterna Zentaris σε συνεργασία με τον Π.Ο.Υ. Η αντιλειτουργική δράση της περιγράφηκε για πρώτη φορά *in vitro* και *in vivo* το 1987, ενώ η από το στόμα δράση της σε μοντέλα ποντικών με σπλαχνική λείσμανίαση αναφέρθηκε το 1992.

Οι πρώτες αναφορές από κλινικές μελέτες για τη θεραπεία της σπλαχνικής λείσμανιασης στην Ινδία ήταν το 1998 και η μιλτεφοσίνη (Impravido®) αναγνωρίστηκε ως φάρμακο για τη θεραπεία της σπλαχνικής λείσμανιασης του ανθρώπου στην Ινδία το Μάρτιο του 2002 και στη Γερμανία το 2004. Η μιλτεφοσίνη αντιπροσωπεύει τον πρώτο αναγνωρισμένο αντι-λειτουργικό παράγοντα με αποτελεσματική χορήγηση από το στόμα. Η Virbac, σε συνεργασία με την Aeterna Zentaris, έχει αναπτύξει ένα ειδικό σκεύασμα για κτηνιατρική χρήση στην Ευρώπη: το Milteforan®.

2.2. Παρασιτοκτόνες ιδιότητες κατά της *Leishmania*

Το δραστικό συστατικό του Milteforan® είναι η μιλτεφοσίνη. Η μιλτεφοσίνη (χημικό όνομα: hexadecylphosphocholine), είναι ένα ανάλογο φωσφολιπιδίου που συνίσταται από εστέρες με ποικίλες μακράς αλυσού κεκορεσμένες και ακόρεστες αλκυλικές ομάδες. Έχει αποδειχτεί ότι έχει παρόμοια δομή με συστατικά που μεταβολίζονται από το παρασιτικό πρωτόζωο *Leishmania*.

Εικόνα 3: Χημική δομή της μιλτεφοσίνης



Νέος τρόπος δράσης: αναστολέας μετάδοσης σημάτων

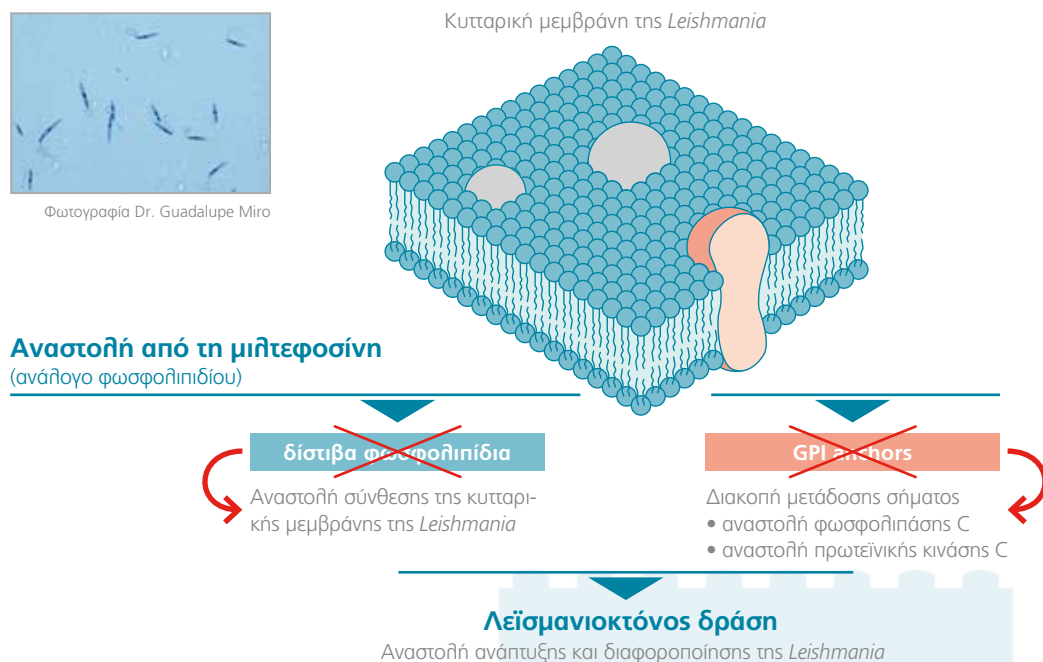
Πολλαπλές μελέτες δείχνουν ότι η μιλτεφοσίνη εκδηλώνει την αντι-λειτουργική της δράση στοχεύοντας στις μεταβολικές οδούς των φωσφολιπιδίων στο παράσιτο (άμεση επίδραση στο μεταβολισμό της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης). Η μιλτεφοσίνη είναι ελαφρώς λιπόφιλη και υδρόφοβη και επομένως μπορεί να διεισδύει στην κυτταρική μεμβράνη και να προκαλεί γρήγορο και έντονο μεταβολισμό των αιθερικών φωσφολιπιδίων στα είδη της *Leishmania*.^{1,2}

Η μιλτεφοσίνη διαταράσσει τις οδούς μετάδοσης σημάτων στο κύτταρο και τη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης στο παράσιτο³⁷ με τους ακόλουθους μηχανισμούς:

- Αναστέλλει τη **βιοσύνθεση των GPI anchors** (γλυκοζυλοφωσφατιδυλο-ινοσιτόλη) μόρια που συγκρατούν άλλα μόρια - κλειδιά της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης, τα οποία είναι απαραίτητα για την ενδοκυτταρική επιβίωση των αμαστιγωτών της *Leishmania*.^{27,29}
- Διαταράσσει τη **μετάδοση σημάτων στο κύτταρο** δρώντας πάνω στην ειδική **φωσφολιπάση C** και **πρωτεϊνική κινάση C²⁸** της *Leishmania* – ένζυμα που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού και στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης της *Leishmania*.
- Αναστέλλει τη **βιοσύνθεση της φωσφατιδοχολίνης** – ένα μόριο κλειδί στη δίστιβη λιπιδική κυτταρική μεμβράνη της *Leishmania*.

Λόγω των επιδράσεων αυτών στις μιτογενείς οδούς του παρασίτου, η μιλτεφοσίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο με μηχανισμό παρόμοιο εκείνου της απόπτωσης.⁴⁸ Επίσης, θεωρείται ότι ενεργοποιεί ορισμένες ανοσολογικές λειτουργίες.^{22, 32, 33}

Εικόνα 4: Νέος τρόπος δράσης της μιλτεφοσίνης με αναστολή σύνθεσης της μεμβράνης και διακοπή των οδών μετάδοσης σημάτων στην κυτταρική μεμβράνη του παρασίτου



***In vitro* λεϊσμανιοκτόνος δράση**

Μελέτες *in vitro* για τη δράση της μιλτεφοσίνης κατά 6 διαφορετικών ειδών *Leishmania* έδειξαν:

- Σημαντική δράση κατά της προμαστιγωτής εξωκυτταρικής μορφής: σε μελέτες με χρόνο έκθεσης από 48-72 ώρες πλήρης αναστολή της ανάπτυξης παρατηρήθηκε σε 30 μM συγκέντρωση ενώ η LD_{50} * κυμάνθηκε από 0.5-1.0 μM .^{15,24,47}
- Δράση κατά της ενδοκυτταρικής αμαστιγωτής μορφής: σε καθιερωμένο μοντέλο περιτοναϊκών μακροφάγων του ποντικού, παρατηρήθηκε 95% εξόντωση των ενδοκυτταρικών παρασίτων σε συγκέντρωση μιλτεφοσίνης 30 μM . Μελέτες έδειξαν ότι μετά από 96-120 ώρες έκθεση στο φάρμακο, η LD_{50} κυμάνθηκε από 1 έως 11 μM .^{10,11,12,15}

Σε μία συγκριτική μελέτη, εκτιμήθηκε η ευαισθησία στη μιλτεφοσίνη των προμαστιγωτών και αμαστιγωτών μορφών 6 διαφορετικών ειδών *Leishmania*. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η *L. donovani* (η *L. infantum* είναι μέρος του συμπλέγματος της *L. donovani*) ήταν το περισσότερο ευαίσθητο, ενώ η *L. major* ήταν το λιγότερο ευαίσθητο είδος στη δράση της μιλτεφοσίνης, αν και όπως φαίνεται παρακάτω εξακολουθεί να προσβάλλεται από σχετικά χαμηλές δόσεις μιλτεφοσίνης.¹⁵

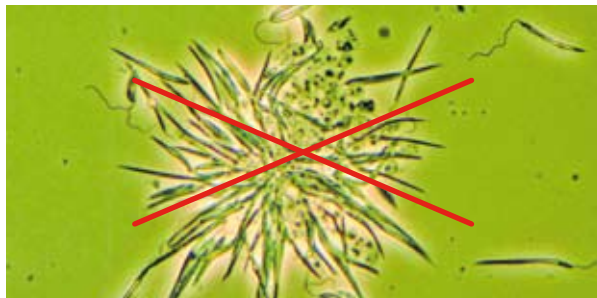
Είδη της <i>Leishmania</i>	Δράση κατά των προμαστιγωτών (ED_{50} σε μM)	Δράση κατά των αμαστιγωτών (ED_{50} σε μM)
<i>L. donovani</i> = περισσότερο ευαίσθητο	0.4 – 0.5 μM	3.3 – 4.6 μM
<i>L. major</i> = λιγότερο ευαίσθητο	4.8 – 13.1 μM	31.6 – 37.2 μM

* ED_{50} = μέση αποτελεσματική δόση για το 50% του πληθυσμού των παρασίτων που εκτίθενται στο φάρμακο

Η φθίνουσα σειρά ευαισθησίας στη μιλτεφοσίνη ήταν η ακόλουθη:

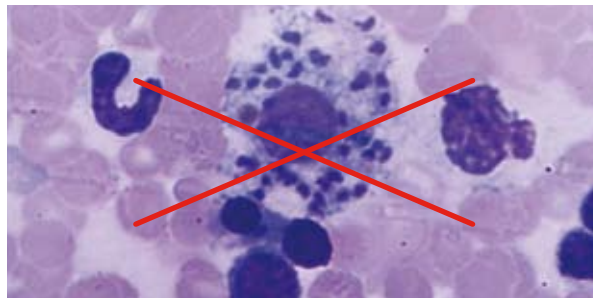
L. donovani (*L. donovani* var. *infantum*) > *L. aethiopica* > *L. tropica* > *L. panamensis* > *L. mexicana* > *L. major*

Milteforan®: σημαντική δράση κατά των
εξωκυτταρικών προμαστιγωτών



Φωτογραφία Dr. Molina

Milteforan®: σημαντική δράση κατά των
ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών



Φωτογραφία Dr. Guadalupe Mir

***In vivo* λείσμανιοκτόνος δράση**

- Η χορήγηση μιλτεφοσίνης από το στόμα 20 mg/kg Σ.Β. για 5 συνεχόμενες ημέρες, συνέβαλε στη μείωση κατά **95%** των αμαστιγωτών μορφών της *L. infantum* στο ήπαρ και κατά **78%** στο σπλήνα (BALB/c μοντέλο ποντικών).^{24,25}
- Συγκριτική μελέτη μεταξύ μιλτεφοσίνης (20 mg/kg Σ.Β. από το στόμα για 5 ημέρες) και αντιμονιούχου μεγλουμίνης (200 mg/kg υποδορίως για 5 ημέρες) έδειξε μεγαλύτερη μείωση των παρασίτων της *L. infantum* στο σπλήνα των ποντικών στους οποίους χορηγήθηκε μιλτεφοσίνη: **99%** μείωση με τη μιλτεφοσίνη και **28%** μείωση με την αντιμονιούχο μεγλουμίνη, ενώ η αποτελεσματικότητά της διατηρούνταν για 7 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας.⁵⁴
- **Άμεση αντι-παρασιτική δράση σε ποντικούς με ανοσοανεπάρκεια:** Η μιλτεφοσίνη χορηγούμενη στη δόση των 30 mg/Kg Σ.Β. από το στόμα για 5 ημέρες, είχε ως αποτέλεσμα την εξόντωση του **95%** των παρασίτων σε ποντικούς με ανεπάρκεια των Τ και Β λεμφοκυττάρων (*scid* ποντικοί), ενώ οι πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονιού (χορηγούμενες στη δόση των 45 mg/kg Σ.Β. υποδορίως για 5 ημέρες) εξόντωσαν μόνο το **20%** των παρασίτων. Αυτό δείχνει ότι η επαρκής λειτουργία των Τ και Β λεμφοκυττάρων δεν είναι απαραίτητη για τη δράση της μιλτεφοσίνης, ενώ η τελευταία είναι αποτελεσματική σε ποντικούς με ανεπάρκεια των Τ λεμφοκυττάρων και σε εκείνους που στερούνται τους παρασιτοκτόνους μηχανισμούς των μακροφάγων. Αντίθετα, η δράση των αντιμονιούχων εξαρτάται από την καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και κατά κύριο λόγο της κυτταρικής ανοσίας, του τύπου και της κατάστασης των μακροφάγων του ξενιστή.^{16,32,33}

Milteforan®:

Καινοτόμος δράση

Λείσμανιοκτόνος δράση *in vitro* και *in vivo*

Άμεση αντιπαρασιτική δράση ανεξάρτητη από τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος

2.3. Φαρμακοκινητική της μιλτεφοσίνης

Εκτεταμένες μελέτες φαρμακοκινητικής πραγματοποιήθηκαν για τη μιλτεφοσίνη σε ζώα του εργαστηρίου και σε σκύλους. Η μιλτεφοσίνη μετρήθηκε στο πλάσμα του αίματος, στα ούρα και στα κόπρανα του σκύλου με τις μεθόδους HPLC και MSMS.^{46,55,57}

Οι μελέτες αυτές έδειξαν τα ακόλουθα:

- **Ταχεία και πλήρη απορρόφηση μετά από χορήγηση από το στόμα**

Έχει αποδειχτεί σε αρουραίους και σκύλους, ότι η βιοδιαθεσιμότητα της μιλτεφοσίνης είναι 82% και 94% αντίστοιχα, με τη μέγιστη συγκέντρωση (T_{max}) να επιτυγχάνεται μετά από 8 έως 48 ώρες.

Η ταχεία απορρόφηση της μιλτεφοσίνης από το γαστρεντερικό σωλήνα στηρίζει τη δράση και τη χορήγηση της από το στόμα

- **Χαμηλός ρυθμός αιματικής κάθαρσης**

Έχει αποδειχτεί ότι ο ρυθμός κάθαρσης του πλάσματος στους αρουραίους και σκύλους είναι πολύ χαμηλός.

Στο σκύλο, μετά από επανειλημμένη χορήγηση της μιλτεφοσίνης από το στόμα με την τροφή για 28 ημέρες, η κάθαρση του πλάσματος προσδιορίστηκε στα 3.40 ± 0.447 mL/kg/h που αντιστοιχούν σε ένα συνολικό ρυθμό απέκκρισης περίπου 0.06% για ένα σκύλο 10 kg Σ.Β. Αυτό υποδηλώνει ότι στο σκύλο, ο μεταβολισμός του φαρμάκου σε διάφορους μεταβολίτες είναι μικρός και ότι δεν μεταβολίζεται κατά την πρώτη δίοδό του από το ήπαρ.

Η μιλτεφοσίνη παραμένει ενεργή, αμετάβλητη και διαθέσιμη για μεγάλο χρονικό διάστημα στους ιστούς

- **Μακρά ημιπερίοδος αποβολής του φαρμάκου ($t_{1/2}$)**

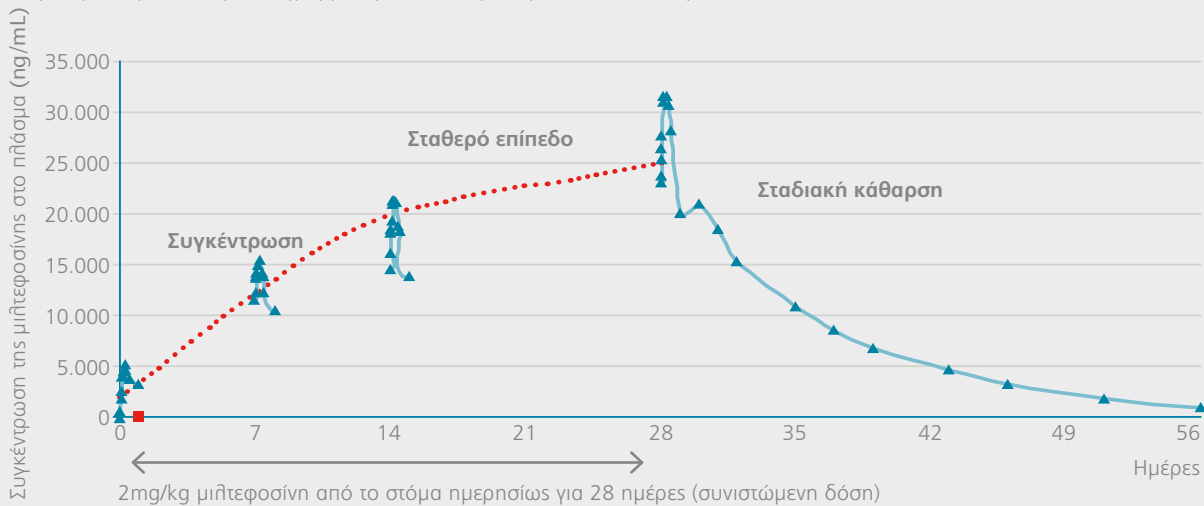
Η ημιπερίοδος οριστικής απομάκρυνσης του φαρμάκου στον αρουραίο και το σκύλο είναι περίπου 80 ώρες (3.3 ημέρες) και 153 ± 13.7 ώρες (6.3 ημέρες), αντίστοιχα. Αυτή η μακρά ημιπερίοδος οριστικής απομάκρυνσης μπορεί να ερμηνευθεί από τον χαμηλό ρυθμό κάθαρσης του πλάσματος από τη μιλτεφοσίνη. Με βάση αυτό, μετά από περίπου 3-4 εβδομάδες καθημερινής χορήγησης μιλτεφοσίνης στο σκύλο αναμένεται ένα «σταθερό επίπεδο» του φαρμάκου στο αίμα.

Στο σκύλο, επανειλημμένη χορήγηση μιλτεφοσίνης 2 mg/kg Σ.Β./ημέρα από το στόμα για 28 ημέρες οδήγησε σε δείκτη συγκέντρωσής της 7.65 ± 1.99 . Ο δείκτης συγκέντρωσης είναι ο λόγος ανάμεσα στην ποσότητα της μιλτεφοσίνης (AUC_{0-24hr}) που επιτεύχθηκε στο «σταθερό επίπεδο» και εκείνης που σημειώθηκε μετά την πρώτη χορήγηση του φαρμάκου. Μετά την τελευταία χορήγηση, η C_{max} ήταν 32582 ± 4030 ng/mL με ένα μέσο T_{max} των 5.0 ± 2.0 ωρών.

Η χορήγηση από το στόμα του Milteforan®, μιλτεφοσίνη 2 mg/kg Σ.Β. για 28 ημέρες (συνιστώμενη δόση) επιτυγχάνει ταχεία και αποτελεσματική συγκέντρωση της μιλτεφοσίνης στο πλάσμα η οποία και διατηρείται.

Εικόνα 5: Μέση συγκέντρωση της μιλτεφοσίνης στο πλάσμα (ng/mL) σε σχέση με το χρόνο (ημέρες) στο σκύλο

Το γράφημα αυτό δείχνει την ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης της μιλτεφοσίνης στο πλάσμα μέσα στις πρώτες 2 εβδομάδες θεραπείας, φθάνοντας ένα «σταθερό επίπεδο» μέχρι το τέλος της θεραπείας. Μετά την ολοκλήρωση της θεραπευτικής αγωγής παρατηρείται μία σταθερή και γραμμική μείωση της μιλτεφοσίνης του πλάσματος.



- **Ευρεία κατανομή στους ιστούς - στόχους**

Η μιλτεφοσίνη διαχέεται ευρέως στο σώμα. Η κατανομή [¹⁴C]-μιλτεφοσίνης στους ιστούς μετρήθηκε 11 ημέρες μετά τη χορήγησή της από το στόμα σε αρουραίους. Τα υψηλότερα επίπεδα ραδιενέργειας ανά γραμμάριο ιστού βρέθηκαν στο ήπαρ, το δέρμα, το σπλήνα και στους νεφρούς – όργανα - κλειδιά στα οποία εντοπίζεται η *Leishmania*.

Το Milteforan® φθάνει στα όργανα - κλειδιά και τους εν τω βάθει ιστούς όπου κρύβονται τα παράσιτα της *Leishmania*

- **Μεταβολισμός**

Γενικά, υπάρχει ένας χαμηλός ρυθμός μεταβολικής αποδόμησης και έχει αποδειχτεί ότι η μιλτεφοσίνη μεταβολίζεται στο ήπαρ σε χολίνη (ένα φυσικό συστατικό) και μεταβολίτες που περιέχουν χολίνη.⁶

Χαμηλός ρυθμός ηπατικής μεταβολικής αποδόμησης σε χολίνη, ένα φυσικό, αβλαβές συστατικό

- **Δεν αποβάλλεται από τους νεφρούς**

Κόπρανα και ούρα συλλέχθηκαν από σκύλους κατά τη διάρκεια 10 ημερών μετά την τελευταία χορήγηση του Milteforan®. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από τους σκύλους επιβεβαίωσαν εκείνα που παρατηρήθηκαν στους αρουραίους: η συγκέντρωση της μιλτεφοσίνης στα ούρα ήταν μάλλον χαμηλή και μετά από 3 ημέρες κάτω από το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (20 ng/mL). Η συμμετοχή των νεφρών στη συνολική απέκκριση του φαρμάκου από τον οργανισμό θεωρήθηκε αμελητέα (περίπου 0.03%). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα ούρα είναι μόνο μία δευτερεύουσα οδός απέκκρισης της μιλτεφοσίνης.

Το Milteforan® μπορεί να επιλεγεί για σκύλους με νεφρική δυσλειτουργία χωρίς τροποποίηση της δοσολογίας, ενώ δεν αναμένεται υπερδοσία σε σκύλους με νεφρική ανεπάρκεια στους οποίους γίνεται θεραπεία με το συνιστώμενο δοσολογικό σχήμα

Όπως στους αρουραίους, η χορήγηση του Milteforan® στους σκύλους έδειξε ότι η μιλτεφοσίνη απεκκρίνεται βραδέως με τα κόπρανα. Η μέση απέκκριση που παρατηρήθηκε στα κόπρανα ήταν χαμηλή (0.32 ± 0.13 mL/kg/h), η οποία είναι παρόμοια με τον ρυθμό ροής της χολής στους σκύλους, υποδηλώνοντας ότι η μιλτεφοσίνη που απεκκρίνεται με τα κόπρανα είναι στην πραγματικότητα απέκκριση από τη χολή. Η συμμετοχή των κοπράνων στην συνολική απέκκριση του φαρμάκου από τον οργανισμό ήταν $10 \pm 4.86\%$ που σημαίνει ότι η απέκκριση της μιλτεφοσίνης πιθανόν υφίσταται εκτεταμένο αλλά χαμηλό μεταβολισμό. Καθώς η συμμετοχή των κοπράνων αντιπροσωπεύει περίπου το 10% στη συνολική απέκκριση του φαρμάκου από τον οργανισμό, συμπεραίνεται ότι μόνο το 10% περίπου της χορηγούμενης δόσης του φαρμάκου αποβάλλεται με τα κόπρανα (περίπου 200μg/kg/ημέρα).



2.4. Ατοξικό για τους ιστούς - στόχους

Μελέτες τοξικότητας εφάπαξ δόσης

Μελέτες τοξικότητας εφάπαξ δόσης σε ζώα του εργαστηρίου προσδιόρισε ότι δεν παρατηρήθηκε θνητότητα στους αρουραίους στη δόση των >2000 mg/kg. Τα συμπτώματα τοξίκωσης που παρατηρήθηκαν ήταν ανόρθωση του τριχώματος και μειωμένη κινητική δραστηριότητα στην αρχή της περιόδου έκθεσης (T+4 ώρες).⁵⁹

Με βάση τη τιμή αυτή το Milteforan® κατατάσσεται ως μη επιβλαβές για χορήγηση από το στόμα κατά τη θεραπεία σκύλων με τη συνιστώμενη θεραπευτική δόση (μιλτεφοσίνη 2mg/kg Σ.Β., η οποία είναι ισοδύναμη με Milteforan® 1 mL/10kg Σ.Β.), ο δείκτης ασφάλειας που εξασφαλίζεται είναι 20 (για παράδειγμα αυτό αντιστοιχεί με δόση Milteforan® 20 mL/10kg Σ.Β.).

Μελέτες τοξικότητας επαναλαμβανόμενα υψηλής δόσης

Πολλαπλές μελέτες υποξείας τοξικότητας έδειξαν ότι η μιλτεφοσίνη ήταν καλώς ανεκτή χωρίς παρενέργειες στις ζωτικές λειτουργίες, όταν χορηγούνταν από το στόμα σε ενήλικους αρουραίους γύρω στα 4.5 mg/kg και στους σκύλους γύρω στα 3 mg/kg (1.5 φορά μεγαλύτερη από τη θεραπευτική δόση), για χρονικό διάστημα **μέχρι 13 εβδομάδες** (η συνιστώμενη διάρκεια θεραπείας είναι μόνο 4 εβδομάδες).⁵²

Σε χρόνιες μελέτες τοξικότητας, η милτεφοσίνη χορηγήθηκε σε διαφορετικές δόσεις για **52 εβδομάδες** στους αρουραίους και σκύλους κάτω από συνθήκες πειραματισμού.⁵³ Σε χορήγηση μεγαλύτερη κατά 1.5 φορά της συνιστώμενης θεραπευτικής δόσης στο σκύλο (3 mg/kg Σ.Β. από το στόμα) παρατηρήθηκαν ήπια συμπτώματα όπως σιελόρροια, έμετος και διάρροια. Σε χορήγηση μεγαλύτερη κατά 5 φορές της συνιστώμενης θεραπευτικής δόσης στο σκύλο (10 mg/kg Σ.Β. από το στόμα) οι παρενέργειες αυτές αυξήθηκαν σημαντικά σε σοβαρότητα και συχνότητα. Σε χορήγηση x1 και x2 της θεραπευτικής δόσης 2 και 4 mg/kg Σ.Β. για 28 ημέρες (σε μελέτες ανοχής) το Milteforan® ήταν καλώς ανεκτό σε υγιείς σκύλους και δεν προκάλεσε καμία παρενέργεια, ενώ οι εξετάσεις αίματος και ούρων (γενική αίματος, βιοχημικές αναλύσεις) ήταν φυσιολογικές καθόλη τη διάρκεια της θεραπείας.⁵⁸

Μελέτες για τον προσδιορισμό της δόσης στο σκύλο με φυσική μόλυνση με τη *L. infantum* σε συνθήκες κτηνιατρικής πράξης έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα, με δοσοεξαρτώμενες παρενέργειες από το γαστρεντερικό σωλήνα που ήταν σύντομες και αυτο-περιοριζόμενες.⁶² Στις μελέτες αυτές, το Milteforan® χορηγήθηκε στη δόση των 2 mg/kg Σ.Β./ημέρα και 4 mg/kg Σ.Β./ημέρα για 28 ημέρες. Στους σκύλους που έγινε θεραπεία με 4 mg/kg Σ.Β./ημέρα παρουσιάστηκαν περισσότερες και πιο σοβαρές παρενέργειες, έμετος - διάρροια, σε σύγκριση με εκείνους στους οποίους έγινε θεραπεία με 2 mg/kg Σ.Β./ημέρα. Συνολικά οι παρενέργειες αυτές ήταν ήπιες και δεν επηρέασαν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Συμπερασματικά, η δόση των 2 mg/kg Σ.Β./ημέρα για 28 ημέρες ήταν εξίσου αποτελεσματική με τη διπλάσια δόση και ήταν καλύτερα ανεκτή. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η δόση για τον έλεγχο της ΛΣ, Milteforan® 1mL/10kg Σ.Β./ημέρα για 28 ημέρες.

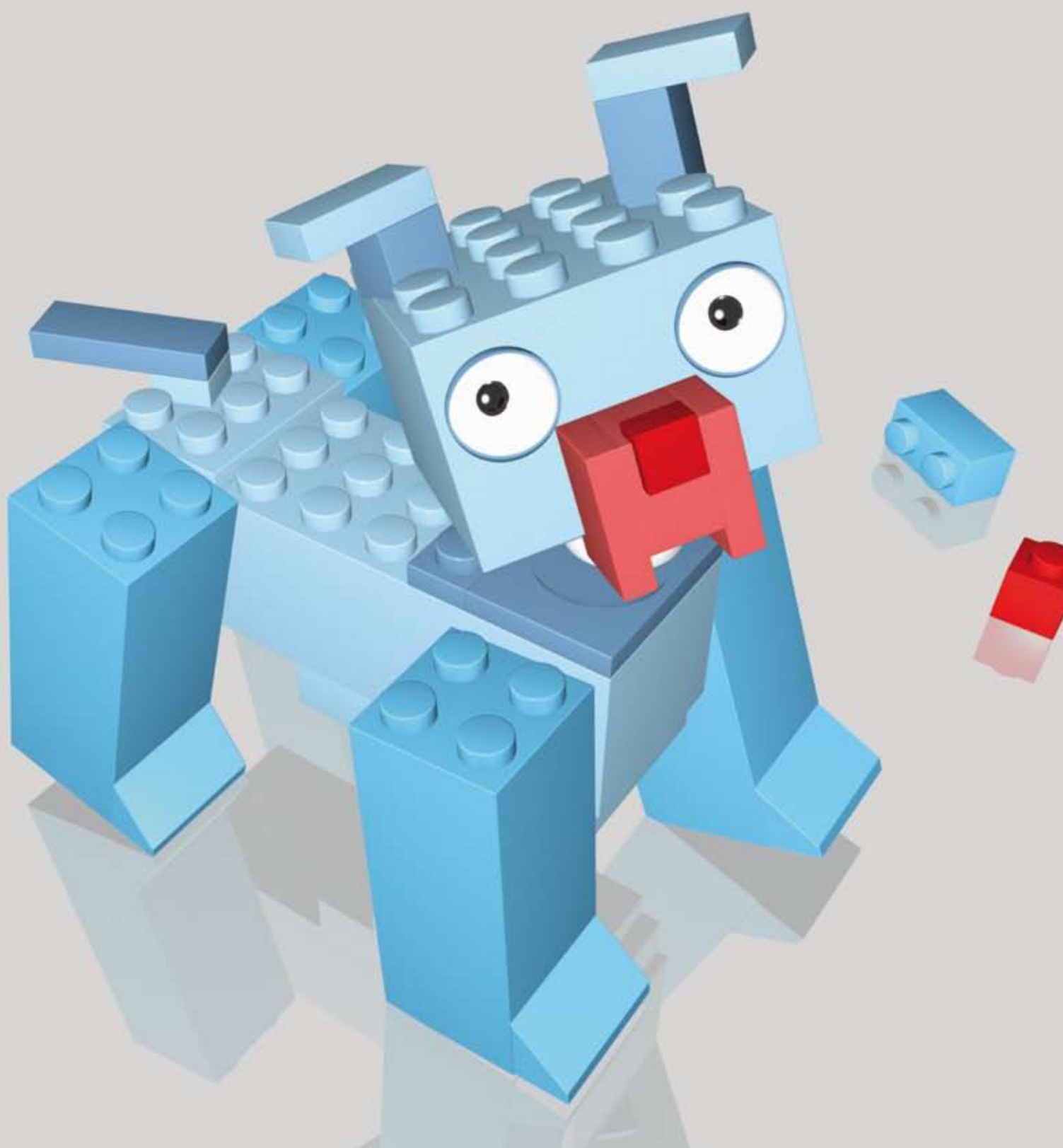
Το Milteforan® ταξινομείται ως αβλαβές χορηγούμενο από το στόμα. Είναι καλώς ανεκτό στη συνιστώμενη δόση για μερικές συνεχόμενες εβδομάδες. Δεν είναι επιβλαβές για τους νεφρούς. Δόση μεγαλύτερη από τη συνιστώμενη προκαλεί δοσοεξαρτώμενες παρενέργειες από το πεπτικό σύστημα.

Τοξικότητα στο γεννητικό σύστημα των θηλυκών σκύλων

Μελέτες για την τοξικότητα στο γεννητικό σύστημα σε αρουραίους έδειξαν εμβρυοτοξική επίδραση με χορήγηση της милτεφοσίνης στη δόση των 1.2 mg/kg. Θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε милτεφοσίνη καθημερινά για 4 εβδομάδες πριν και κατά τη διάρκεια της οχείας μέχρι την ημέρα σύλληψης παρουσίασαν τοξίκωση του εμβρύου και τερατογενέσεις σε υψηλές δόσεις (6.81 mg/kg).⁵⁶

Σε μελέτη 52 εβδομάδων για την τοξικότητα του φαρμάκου σε θηλυκούς σκύλους καταγράφηκαν οι μεταβολές των ωοθηκών σε όλα τα δοσολογικά σχήματα. Παρατηρήθηκε μία δοσοεξαρτώμενη αύξηση του αριθμού των άρρηκτων ωοθυλακίων στις ωοθήκες ενώ στα ζώα που χορηγούνταν υψηλή δόση του φαρμάκου ευρίσκονταν μορφολογικά σε άνοιτρο. Λόγω των παραπάνω ευρημάτων η χρήση του Milteforan® αντενδείκνυται σε έγκυες, θηλάζουσες και σε ζώα αναπαραγωγής.

Λόγω της τοξικότητας στο γεννητικό σύστημα, το Milteforan® δεν πρέπει να χορηγείται σε έγκυες, θηλάζουσες και σε ζώα αναπαραγωγής.



3. Milteforan®: Αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια σε κλινικές μελέτες στην κτηνιατρική πράξη

3.1. Σημαντική βελτίωση της κλινικής εικόνας των σκύλων που νοσούν από λεισμανίαση

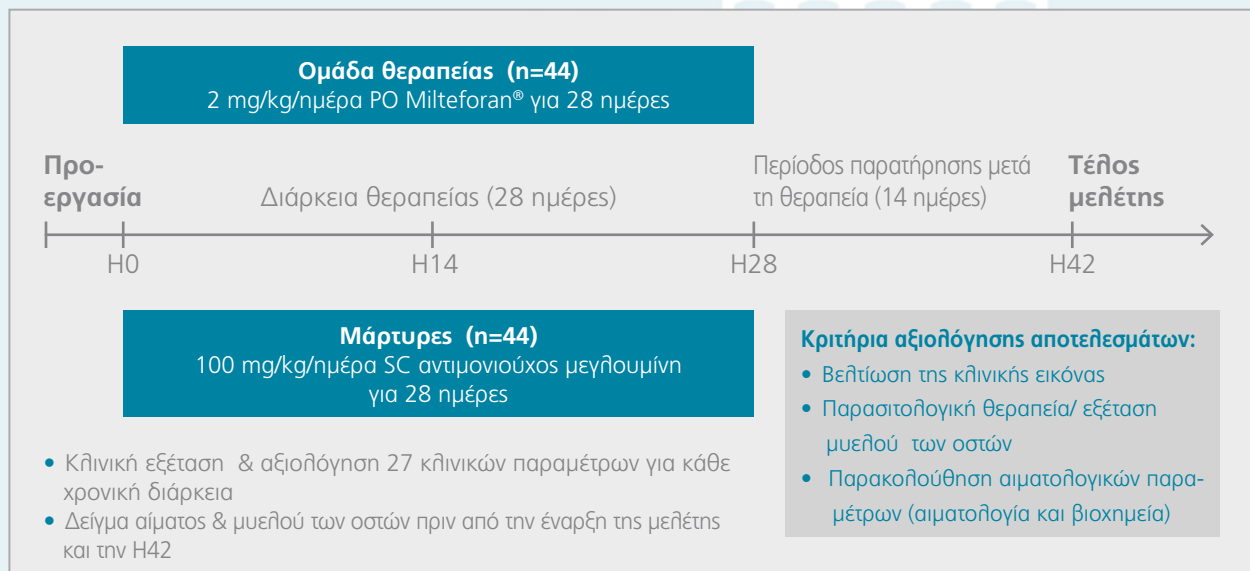
Η милτεφοσίνη έχει δείξει αξιόλογη αποτελεσματικότητα στον άνθρωπο για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης. Τα δεδομένα από όλες τις μελέτες δείχνουν θεραπευτικό αποτέλεσμα της τάξης του 94% στον άνθρωπο.³

Λαμβάνοντας υπόψη τα εκτενή *in vitro* και *in vivo* δεδομένα που αποδεικνύουν την αντι-λεισμανιακή δράση της милτεφοσίνης και την αποτελεσματικότητά της στη θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης του ανθρώπου, ήταν αναμενόμενο ότι η милτεφοσίνη θα είχε σημαντική δράση σε σκύλους με συμπτωματική λεισμανίαση.

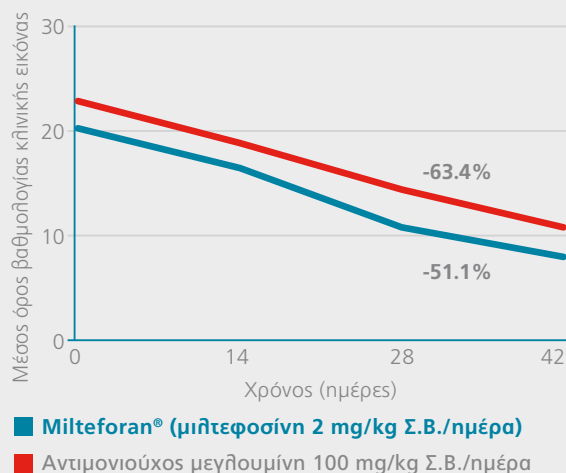
Οι πολλαπλές κλινικές μελέτες στην πράξη με το Milteforan®, που διεξήχθησαν σύμφωνα με τις οδηγίες για την ορθή κλινική πράξη (GCP) έχουν επιβεβαιώσει την αποτελεσματικότητα αυτή, όταν το φάρμακο χορηγείται στη δόση των 2 mg/kg Σ.Β./ημέρα από το στόμα για 28 ημέρες.

■ Σε μία πολυκεντρική, ελεγχόμενη και τυχαία κλινική μελέτη στην κτηνιατρική πράξη αποδείχθηκε ότι το Milteforan® έχει κλινική και παρασιτολογική αποτελεσματικότητα ⁶²

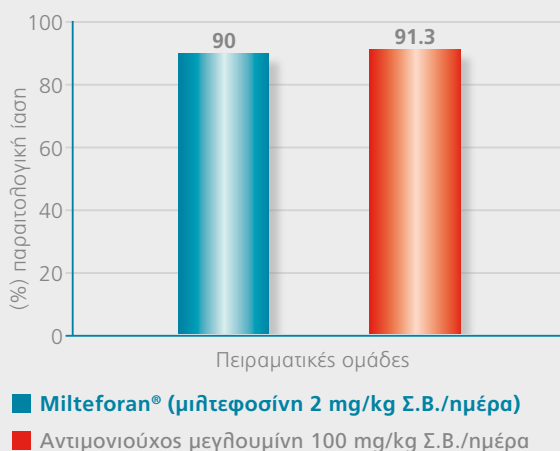
Αυτή η προκαταρκτική μελέτη έγινε σε σκύλους με συμπτωματική λεισμανίαση μετά από φυσική μόλυνση από τη *Leishmania infantum* στη Γαλλία και την Ισπανία. Οι σκύλοι που συμμετείχαν στη μελέτη παρουσίαζαν συμπτώματα της λεισμανίασης και η διάγνωση επιβεβαιώθηκε με ορολογική



Εικόνα 6: Διαχρονική πορεία της βαθμολογίας της μέσης κλινικής αξιολόγησης (n=90)

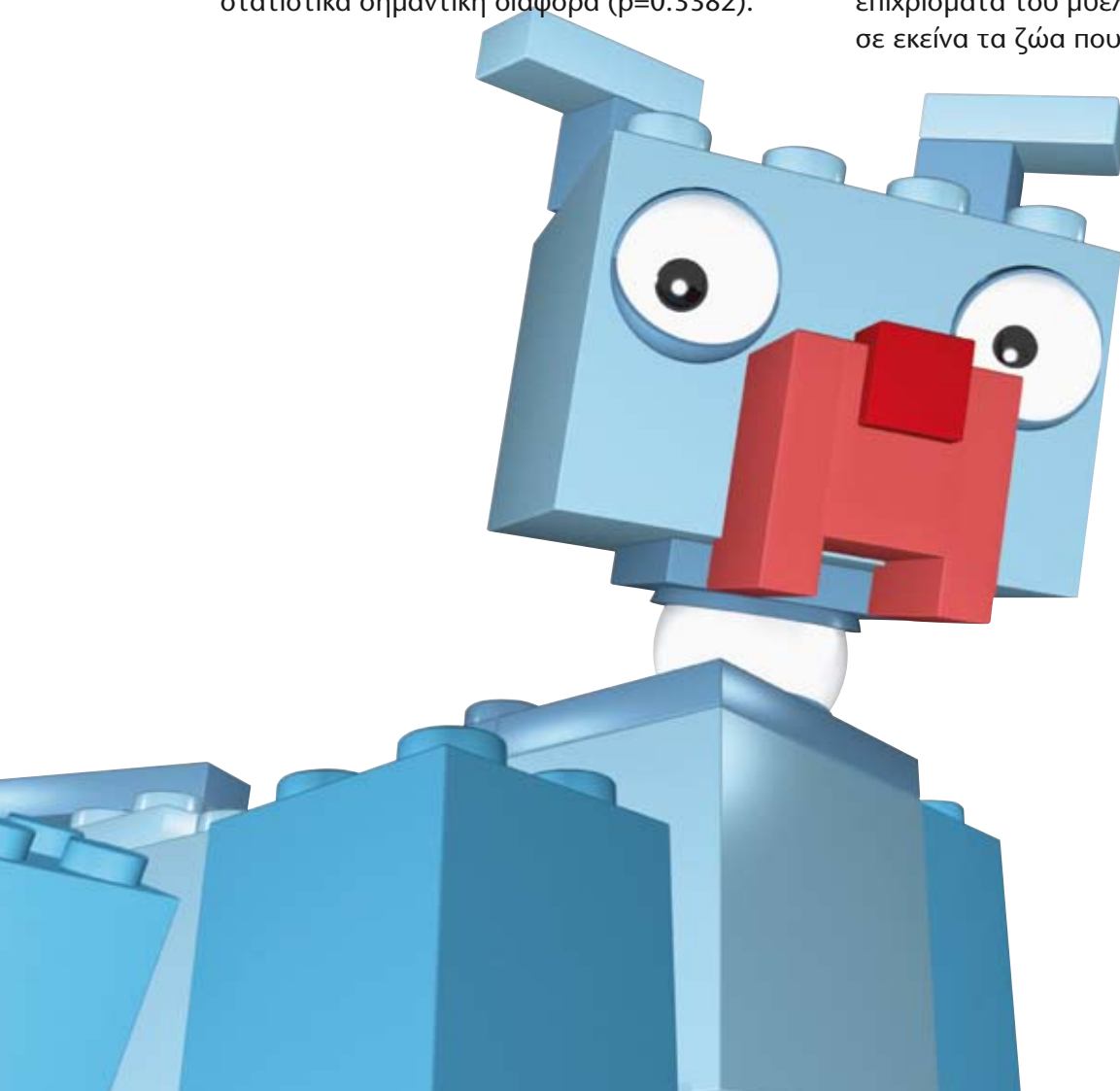


Εικόνα 7: Παρασιτολογική ίαση μετά τη θεραπεία



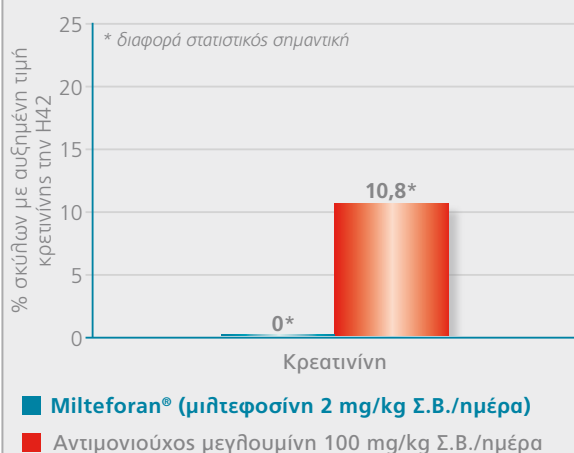
(IFAT) ή κυτταρολογική εξέταση επιχρίσματος ή PCR σε υλικό αναρρόφησης μυελού των οστών. Σε κάθε ομάδα η βαθμολόγηση της κλινικής αξιολόγησης μειώθηκε ομοιόμορφα καθόλη τη διάρκεια της μελέτης. Η μείωση σε κάθε ομάδα ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.0001$), αν και μεταξύ των ομάδων δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0.3382$).

Παρασιτολογική ίαση της τάξης του 90% σημειώθηκε στην ομάδα του Milteforan® και 91.3% στους μάρτυρες χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες ($p = 0.8066$). Ο βαθμός ίασης υπολογίστηκε με βάση το αρνητικό αποτέλεσμα της εξέτασης για *Leishmania* σε επιχρίσματα του μυελού των οστών την H42 σε εκείνα τα ζώα που ήταν θετικά την H0.

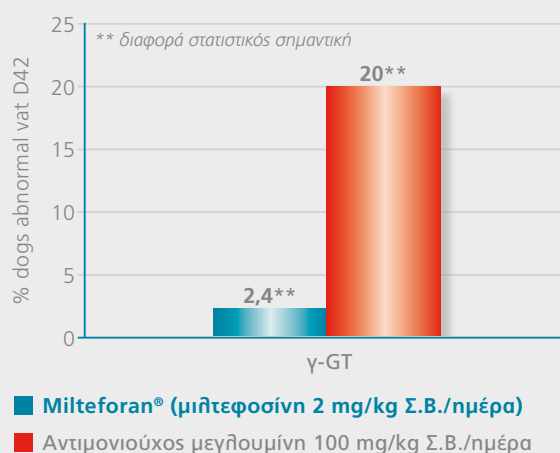


Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ των βιοχημικών παραμέτρων που παρακολουθήθηκαν η κρεατινίνη παρουσιάστηκε αυξημένη στους σκύλους της ομάδας της αντιμονιούχου μεγλουμίνης στο τέλος σε σχέση με τη βασική τιμή που καταγράφηκε στην αρχή της μελέτης. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και για την τιμή της γ-GT. Οι τιμές των λοιπών αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων ήταν μέσα σε φυσιολογικά όρια.

Εικόνα 8α: Διακύμανση της τιμής της κρεατινίνης



Εικόνα 8β: Διακύμανση της τιμής της γ-GT



Δεν υπήρξαν ανεπιθύμητες ενέργειες του Milteforan® στους νεφρούς και το ήπαρ.

Η μελέτη αυτή αποδεικνύει ότι το Milteforan® παρουσιάζει κλινική και παρασιτολογική αποτελεσματικότητα παρόμοια με εκείνη της ομάδας των μαρτύρων, ενώ δεν διαταράσσει ουσιαστικά την λειτουργία των νεφρών και του ήπατος.

Το Milteforan® είναι αποτελεσματικό για τον έλεγχο της λεισμανίασης του σκύλου.

■ Εξαιρετική κλινική ανταπόκριση επιτεύχθηκε με το Milteforan® σε μεγάλης κλίμακας, μεγάλης διάρκειας, πολυκεντρική μελέτη στην κτηνιατρική πράξη.⁵⁰

Ο σχεδιασμός της μελέτης ήταν παρόμοιος με εκείνο της προκαταρκτικής που συζητήθηκε παραπάνω, όμως στην επιβεβαιωτική αυτή μελέτη η διάρκεια παρακολούθησης ήταν μεγαλύτερη (8 εβδομάδες). Διεξήχθη σε 17 κτηνιατρεία και 3 πανεπιστήμια τριών Ευρωπαϊκών χωρών (Ισπανία, Ιταλία και Γαλλία). Εντάχθηκαν 82 σκύλοι στη μελέτη μεταξύ του Μαΐου 2005 και του Ιανουαρίου 2006.

Χρησιμοποιήθηκαν παράμοια κριτήρια ένταξης στη μελέτη και τα ίδια 27 κλινικά συμβατά με τη λεισμανίαση του σκύλου σημεία προσδιορίστηκαν και αξιολογούνταν ανά 14 ημέρες καθόλη τη διάρκεια της μελέτης. Επίσης, από τους κτηνιάτρους ζητήθηκε να σχολιάσουν την αποτελεσματικότητα του Milteforan®.

Εικόνα 9: Δείγμα του φύλλου κλινικής αξιολόγησης. Παρακολουθήθηκαν 27 κλινικές παράμετροι

Δοσολογία mL από το στόμα μία φορά ημερησίως για 28 ημέρες					Ημέρα 0			Ημέρα 14			Ημέρα 28			Ημέρα 42			Ημέρα 56							
Κατάσταση και επηρεασμένα όργανα		Δυσλειτουργία			Αξιολόγηση Κυκλώστε την τιμή της αξιολόγησης																			
Γενική κατάσταση	Όρεξη				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Κατάθλιψη				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Καταπόνηση				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Πόληδιση				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Μύες	Παροδική μυϊκή ατροφία				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Γενικευμένη μυϊκή ατροφία				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Ανοσοποιητικό σύστημα	Αδενοπάθεια				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Σπληνομεγαλία				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Οφθαλμοί	Επιπεφυκτίτιδα και/ή βλεφαρίτιδα				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Κερατίτιδα και/ή ιριδοκυκλίτιδα				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Βλεννογόνοι πεπτικό σύστημα	Χρωματισμός (στοματικού βλεννογ.)				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Επίταση				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Στοματικά - γλωσσικά έλκη και/ή οζίδια				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Έμετος				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Αρθρώσεις	Διάρροια				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Αρθρίτιδα				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Κνησμός				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Ερύθημα				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Έλκη				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Οζίδια				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Αλωπεκία				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	Δυσχρωμία (αποχρωμάτωση και/ή υπερχρωμάτωση)				0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Δέρμα	Διαταραχές κερατινοποίησης	Ελαιοειδής σμηγματόρροια			0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
		Ακανθοκυττάρωση			0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
		Υπερκεράτωση της μύτης και/ή των πελμάτων			0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
		Γενικευμένη υπερκεράτωση			0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
		Ονυχογρύφωση			0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3

Η θεραπεία των σκύλων έγινε με τη χορήγηση του Milteforan® στη δόση (μιλτεφοσίνη 2 mg/kg Σ.Β. μία φορά την ημέρα) με την τροφή για 28 ημέρες. Τα ζώα παρακολουθήθηκαν για περίοδο 28 ημερών μετά το τέλος της θεραπείας μέχρι το τέλος της μελέτης την (H56).

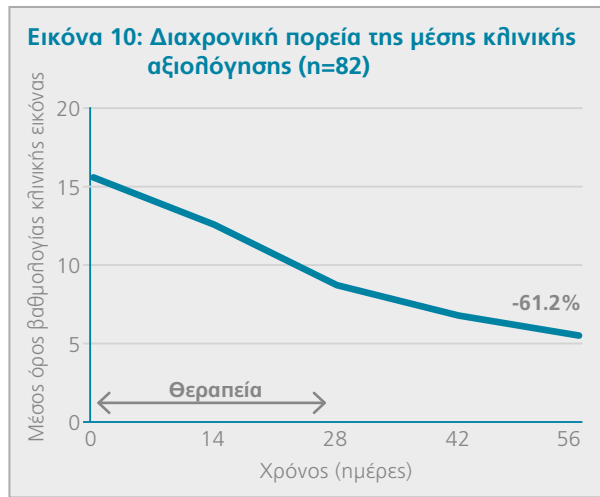
Προ-ένταξη	H0	H14	H28	H42	H56
ΚΕ*	Ένταξη	ΚΕ* και	ΚΕ* και	ΚΕ* και	ΚΕ* και αξιολόγηση
Δείγμα αίματος	ΚΕ* και	αξιολόγηση	αξιολόγηση	αξιολόγηση	Δείγμα αίματος
Δείγμα ΜΟ**	αξιολόγηση				Τέλος της μελέτης
	Θεραπεία από το στόμα με Milteforan®				

* ΚΕ=Κλινική Εξέταση

** ΜΟ=Μυελός των οστών

Όπως φαίνεται στην προηγούμενη μελέτη υπήρξε σημαντική βελτίωση της κλινικής εικόνας κατά τη διάρκεια της περιόδου των 8 εβδομάδων ($p < 0.0001$). Τα συμπτώματα μειώθηκαν κατά μέσο όρο γύρω στο 61.2%:

- Υπήρξε σημαντική βελτίωση της κλινικής εικόνας αμέσως μετά την έναρξη της θεραπείας.
- Η κλινική εικόνα συνέχιζε προοδευτικά να βελτιώνεται για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Το Milteforan® συνέχιζε να δρα και μετά το τέλος της θεραπείας, κάτι που αναμένονταν λαμβάνοντας υπόψη τη φαρμακοκινητική της μιλτεφοσίνης.

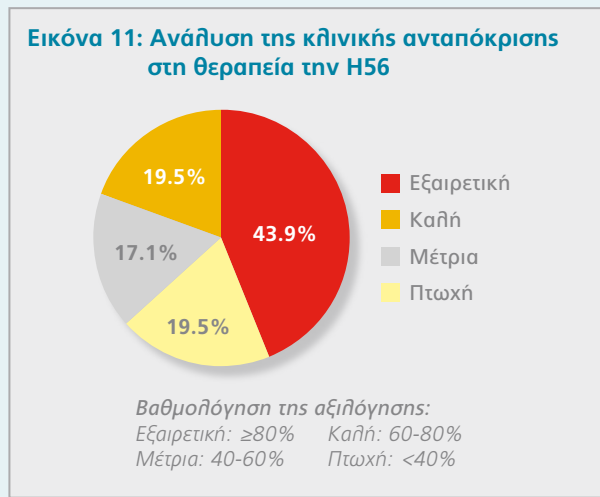


Αξίζει να σημειωθεί ότι σκύλοι που παρουσίαζαν υποτροπιάζουσα λείσμανίαση ανταποκρίθηκαν εξίσου καλά με εκείνους που εμφάνιζαν τη νόσο για πρώτη φορά.

Μέση τιμή αξιολόγησης την H56

Εμφάνιση λείσμανίασης για πρώτη φορά = 59.7%

Υποτροπιάζουσα λείσμανίαση = 64%



Όταν εκτιμήθηκε η συνολική κλινική εικόνα, το 80% των σκύλων εμφάνισε από μέτρια έως εξαιρετική βελτίωση των συμβατών με τη λείσμανίαση του σκύλου συμπτωμάτων.

Η γνώμη του ερευνητού για το αποτέλεσμα της θεραπείας με Milteforan® συγκρίθηκε με εκείνη από συνηθισμένες ή προηγούμενες θεραπευτικές αγωγές που δόθηκαν σε σκύλους με λείσμανίαση. Τις περισσότερες φορές το Milteforan® συγκρίθηκε με το συνδυασμό της αντιμονιούχου μεγλουμίνης με αλλοπουρινόλη.

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι το 83% των σκύλων που θεραπεύτηκαν με Milteforan® εκτιμήθηκε ότι είχαν καλύτερη ή ίδια ανταπόκριση σε σχέση με προηγούμενες ή συνηθισμένες θεραπείες.

% των περιστατικών	Περισσότερο αποτελεσματική	Το ίδιο αποτελεσματική	Λιγότερο αποτελεσματική
Αντιληπτή αποτελεσματικότητα του Milteforan® σε σχέση με: Συνήθη θεραπεία (εμφάνιση της λείσμανιάσης για πρώτη φορά) και ήδη εφαρμοσθείσες θεραπείες (υποτροπιάζουσα λείσμανιάση)	37%	46%	17%

Το ποσοστό συμμόρφωσης ήταν της τάξης του 87.8% για την περίοδο θεραπείας των 28 ημερών, που αποδεικνύει ότι το διάλυμα ήταν καλά ανεκτό από τους σκύλους και εύκολα χορηγήσιμο από τους ιδιοκτήτες. Εκείνοι από τους τελευταίους οι οποίοι δεν συμμορφώθηκαν, είτε εκ παραδρομής συνέχισαν τη θεραπεία πέραν των 28 ημερών είτε την σταμάτησαν πριν από τη χρονική περίοδο των 28 ημερών από λάθος.

Αυτή η κλινική μελέτη πεδίου διενεργήθηκε σε ένα μεγάλο αριθμό και διαφόρων φυλών και ηλικιών σκύλων μολυσμένων με την *Leishmania infantum* στους οποίους η διάγνωση βασίστηκε στην κλινική εικόνα και στις εργαστηριακές εξετάσεις (ορολογικές, PCR και μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων μυελού των οστών).

Τα αποτελέσματα δείχνουν μία εξαιρετική κλινική ανταπόκριση με το Milteforan® στη δόση μιλτεφοσίνη 2 mg/kg Σ.Β. μία φορά την ημέρα για 28 ημέρες και επιβεβαιώνουν την ευκολία στη χορήγησή του

■ Δραματική μείωση του παρασιτικού φορτίου της *Leishmania* σε φυσικά μολυσμένους σκύλους μετά τη θεραπεία με Milteforan® ⁵¹

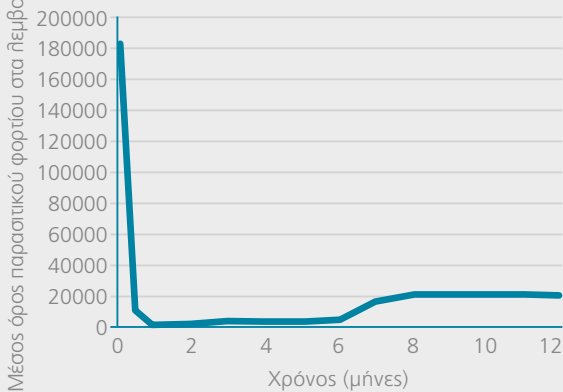
Η δοκιμή της real-time PCR χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση του DNA της *Leishmania* στο αίμα και τα λεμφογάγγλια 18 σκύλων με συμπτώματα της ΛΣ στο Πανεπιστήμιο της Νεάπολης, πριν και μετά τη θεραπεία με 2 mg μιλτεφοσίνη/kg Σ.Β./ημέρα (Milteforan®) για 30 ημέρες. Τα ζώα αυτά αξιολογούνταν κλινικά και παρασιτολογικά κάθε μήνα για 12 μήνες.

Η ανάλυση των προκαταρκτικών δεδομένων γινόταν σύμφωνα με τη μέθοδο LOCF (Last Observation Carried Forward). Κατά το χρόνο της διάγνωσης, το ανιχνεύσιμο φορτίο του DNA της *Leishmania* ήταν υψηλότερο στο υλικό αναρρόφησης από τα λεμφογάγγλια σε σχέση με το αίμα των μολυσμένων σκύλων.

Μετά από 1 μήνα θεραπείας με Milteforan® παρατηρήθηκε μείωση του παρασιτικού φορτίου στα δείγματα και από τους δύο ιστούς. Αυτό σχετιζόταν με την κλινική βελτίωση και την εξαφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου.

	Μέσο παρασιτικό φορτίο (<i>Leishmania</i> DNA/μL) στο αίμα και τα λεμφογάγγλια ανάλογα με το χρόνο					
	Πριν από τη χρήση του Milteforan® T 0		Μετά τη χρήση του Milteforan® T 1 μήνας		Παρακολούθηση T 5 μήνες	
	m ± std	n	m ± std	n	m ± std	n
Αίμα	256.2 ± 260.1	18	164.8 ± 211.8	17	111.8 ± 152.8	18
Λεμφογάγγλια	182367.7 ± 192141.6	18	2172.3 ± 3626.4	18	2534.9 ± 4069.9	18

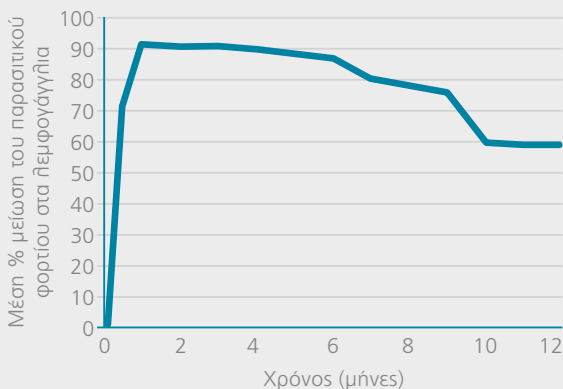
Εικόνα 12: Η χρονική διακύμανση του μέσου παρασιτικού φορτίου (*Leishmania* DNA/μL) στα λεμφογάγγλια



Παρατηρήθηκε μία θεαματική μείωση του παρασιτικού φορτίου στα λεμφογάγγλια

Μετά από μόλις δύο εβδομάδες θεραπείας, το παρασιτικό φορτίο μειώθηκε δραματικά και παρέμεινε χαμηλό για 5 μήνες μετά τη θεραπεία. Ακολούθως, το παρασιτικό φορτίο αυξήθηκε αργά αλλά παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα μέχρι 12 μήνες μετά τη θεραπεία με Milteforan®.

Εικόνα 13: Η χρονική διακύμανση της μέσης % μείωσης παρασιτικού φορτίου (*Leishmania* DNA/μL) στα λεμφογάγγλια



Μετά από 1 μήνα θεραπεία με Milteforan®, το μέσο ποσοστό μείωσης του παρασιτικού φορτίου στα λεμφογάγγλια ήταν **91.8%** (± 8.9).

Σε περισσότερους από τους μισούς σκύλους παρατηρήθηκε ένα σταθερά υψηλό ποσοστό μείωσης του παρασιτικού φορτίου μέχρι το τέλος της παρακολούθησης. Σε ορισμένους σκύλους παρατηρήθηκε μία απότομη πτώση στην ποσοστιαία μείωση στους 10 μήνες μετά τη θεραπεία με Milteforan® κάτι που ήταν ταυτόχρονο με την κλινική υποτροπή της νόσου.

Το Milteforan® έδειξε υψηλή αποτελεσματικότητα στη μείωση του παρασιτικού φορτίου σε διαφορετικούς ιστούς ενώ διατηρεί τον αριθμό των παρασίτων χαμηλό για μήνες

Milteforan®:

Επιβεβαιωμένη κλινική και παρασιτολογική αποτελεσματικότητα σε μελέτες στην πράξη. Εύκολο στη χορήγηση πόσιμο διάλυμα για αυξημένη συμμόρφωση του ιδιοκτήτη.

Η ΝΕΑ ΕΠΟΧΗ για τον έλεγχο της λεισμανίασης του σκύλου

3.2. Αποδεδειγμένη ασφάλεια στη συνιστώμενη δόση

Κλινικές μελέτες στην πράξη (όλες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες GCP) έχουν δείξει ότι το Milteforan® είναι καλώς ανεκτό όταν χορηγείται στη συνιστώμενη δόση μιλτεφοσίνη 2 mg/kg Σ.Β. ημερησίως για 28 ημέρες με την τροφή.

• **Καμία ανεπιθύμητη ενέργεια στις αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους: φιλικό στη νεφρική λειτουργία** Συστηματική παρακολούθηση των αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων (ιδιαίτερα εκείνων που προσδιορίζουν τη νεφρική και ηπατική λειτουργία) σε όλες τις μελέτες πεδίου δεν έδειξε ανεπιθύμητη ενέργεια όταν το Milteforan® χορηγούνταν στη δόση των 2 mg/kg ημερησίως, ενώ κανένας σκύλος δεν απομακρύνθηκε από τη μελέτη εξαιτίας ανεπιθύμητων ενεργειών.

• **Μπορεί να παρατηρηθούν περιστασιακά παρενέργειες από το πεπτικό σύστημα, όμως είναι ήπιες και αυτοπεριοριζόμενες**
Σε όλες τις κλινικές μελέτες στην πράξη, που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες GCP, έγινε θεραπεία με Milteforan® σε συνολικά 173 σκύλους στη εγκεκριμένη δόση. Η παρουσία των παρενεργειών στο πεπτικό σύστημα παρουσιάζεται συνοπτικά στον πίνακα αυτό:
Μικρότερος αριθμός σκύλων παρουσίασε παρενέργειες από το πεπτικό σύστημα όταν το Milteforan® αναμείχτηκε με την τροφή παρά όταν χορηγήθηκε κατευθείαν στο στόμα.

Παρενέργειες από το γαστρεντερικό του Milteforan®	Ποσοστό σκύλων (N=173)
Ναυτία/Έμετος	16.2% (n=28)
Διάρροια	11.6% (n=20)
Ανορεξία	4.6% (n=8)

Ο έμετος, που είναι η κυριότερη παρενέργεια, παρατηρήθηκε να συμβαίνει μία φορά την ημέρα και στα περισσότερα περιστατικά διήρκεσε 1 ή 2 ημέρες.

Διάρκεια του έμετου	Ποσοστό σκύλων με έμετο (n=28)	Συχνότητα στο σύνολο των σκύλων (N=173)
1-2 ημέρες	57.1% (n=16)	9.2%
3-7 ημέρες	25% (n=7)	4%
>7 ημέρες	17.8% (n=5)	2.9%

Η συχνότητα εμφάνισης διάρροιας ήταν μικρότερη και διήρκεσε μόνο 1-2 ημέρες στην πλειονότητα των περιστατικών.

Διάρκεια της διάρροιας	Ποσοστό σκύλων με διάρροια (n=20)	Συχνότητα στο σύνολο των σκύλων (N=173)
1-2 ημέρες	40% (n=8)	4.6%
3-7 ημέρες	25% (n=5)	2.9%
>7 ημέρες	30% (n=6)	3.5%

Οι παρενέργειες αυτές από το πεπτικό σύστημα συνέβησαν περίπου μέσα σε 5-7 ημέρες από την έναρξη της θεραπείας με το Milteforan®, όμως δεν επηρέασαν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας ενώ δεν χρειάστηκε να διακοπεί η θεραπεία ή να μειωθεί η δόση.

Το Milteforan® χορηγούμενο στη συνιστώμενη δόση (2 mg/kg/ημερησίως):
Δεν αντενδείκνυται σε σκύλους με νεφρική νόσο
Τα ήπια γαστρεντερικά συμπτώματα που περιστασιακά εμφανίζονται
είναι παροδικά και αυτοπεριοριζόμενα
Δεν χρειάζεται μείωση της δόσης ή διακοπή της θεραπείας

3.3. Ασφαλές και αποτελεσματικό σε συνδυασμό με αλλοπουρινόλη

Σύμφωνα με μία πρόσφατη ανασκόπηση το σύγχρονο πρωτόλλογο θεραπείας για τη ΛΣ είναι η χρήση της αντιμονιούχου μεγλουμίνης σε συνδυασμό με αλλοπουρινόλη για ένα μήνα (λεισμανιοκτόνος φάση εφόδου) που ακολουθείται από αλλοπουρινόλη μόνο για μερικούς μήνες ως θεραπεία συντήρησης (λεισμανιοστατική δράση) αλλά και για να μειώσει την πιθανότητα μετάδοσης του παρασίτου στη σκνίπα μεταδότη.³⁵

Επειδή το Milteforan® μπορεί να θεωρηθεί ως η λεισμανιοκτόνος επιλογή νέας γενιάς, είναι πιθανόν ότι αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την αλλοπουρινόλη στην πράξη, για τους ίδιους λόγους που περιγράφηκαν παραπάνω για τη συνδυασμένη χρήση με την αντιμονιούχο μεγλουμίνη. Επομένως, θεωρήθηκε απαραίτητο να εκτιμηθεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της συνδυασμένης θεραπείας του Milteforan® με την αλλοπουρινόλη.

■ Μια ειδική μελέτη τοξικότητας συμπεραίνει ότι ο συνδυασμός της αλλοπουρινόλης και μιλτεφοσίνης δεν θα δημιουργούσε καμία παρενέργεια και ότι τα δύο μόρια θεωρούνται τοξικολογικά συμβατά.²⁶

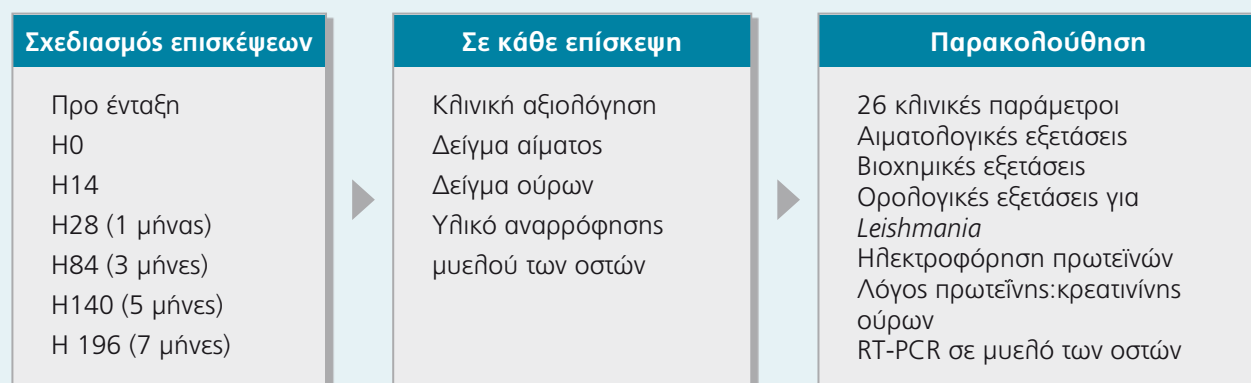
Η μελέτη βασίστηκε στην υπάρχουσα βιβλιογραφία και δημοσιεύσεις για το καθένα από τα δύο μόρια. Οι πιθανές αλληλεπιδράσεις εκτιμήθηκαν από φαρμακολογική, τοξικολογική και φαρμακοκινητική πλευρά.

■ Μία μελέτη ασφάλειας σε υγιείς σκύλους φυλής Beagle επιβεβαίωσε ότι δεν υπάρχουν παρενέργειες από τη χορήγηση του Milteforan® σε συνδυασμό με την αλλοπουρινόλη.⁴⁹

Σε μία ομάδα σκύλων χορηγήθηκε ο συνδυασμός θεραπείας του Milteforan® με την αλλοπουρινόλη για 28 ημέρες, ενώ σε μία άλλη ομάδα (μάρτυρες) χορηγήθηκε μόνο το Milteforan® για 28 ημέρες. Οι σκύλοι παρακολουθούνταν καθημερινά και δείγματα αίματος λαμβάνονταν κάθε 2 εβδομάδες για 6 εβδομάδες.

Τα ζώα παρέμειναν υγιή και τα αποτελέσματα των εξετάσεων του αίματος αμετάβλητα καθόλη τη διάρκεια της θεραπείας και της παρακολούθησης

■ Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα από πολυ-κεντρική ελεγχόμενη μελέτη πεδίου που βρίσκεται σε εξέλιξη, επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του συνδυασμού Milteforan®-αλλοπουρινόλης για την θεραπεία της λεισμανίασης το σκύλου μετά από φυσική μόλυνση.³⁰



Σκύλοι από τη Γαλλία, Ιταλία και Ισπανία που παρουσίαζαν συμπτώματα συμβατά με τη λείσμανίαση και επιβεβαιώθηκε η διάγνωση της λείσμανίασης με ορολογικές εξετάσεις εντάχθηκαν στη μελέτη και τους χορηγήθηκε ένα από τα ακόλουθα θεραπευτικά σχήματα:

Ομάδα 1: Milteforan® στη δόση των 2 mg μιλτεφοσίνη/kg Σ.Β./ημέρα από το στόμα για 28 ημέρες και 10 mg αλλοπουρινόλη/kg Σ.Β./από το στόμα 2 φορές την ημέρα για 7 μήνες.

Ομάδα 2: Αντιμονιούχος μεγλουμίνη στη δόση των 100mg/kg Σ.Β./ημέρα υποδορίως για 28 ημέρες και 10 mg αλλοπουρινόλη/kg Σ.Β./από το στόμα 2 φορές την ημέρα για 7 μήνες.

Συνολικά, 73 σκύλοι εντάχθηκαν στην μελέτη: 37 σκύλοι στην ομάδα 1 και 36 σκύλοι στην ομάδα 2. Η στατιστική ανάλυση ήταν εφικτή για τους 72 σκύλους, καθώς ένα ζώο χάθηκε για να επανεξετασθεί την ημέρα 14.

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ηλικία, το φύλο, τη φυλή, την κλινική αξιολόγηση ή τις εργαστηριακές παραμέτρους όλων των σκύλων κατά την έναρξη της θεραπείας, αντανakλώντας ένα ομοιογενή πληθυσμό. Ορισμένες εργαστηριακές εξετάσεις ήταν επίσης ενδεικτικές της μόλυνσης από *Leishmania*.

Καμία παρενέργεια ή σημαντική αλλαγή στις παραμέτρους που προσδιορίζουν τη νεφρική και ηπατική λειτουργία δεν παρατηρήθηκαν και στις δύο ομάδες κατά τη διάρκεια των 28 ημερών θεραπείας.

Παρατηρήθηκε κλινική βελτίωση και στις δύο ομάδες κατά τη διάρκεια των 28 ημερών θεραπείας:

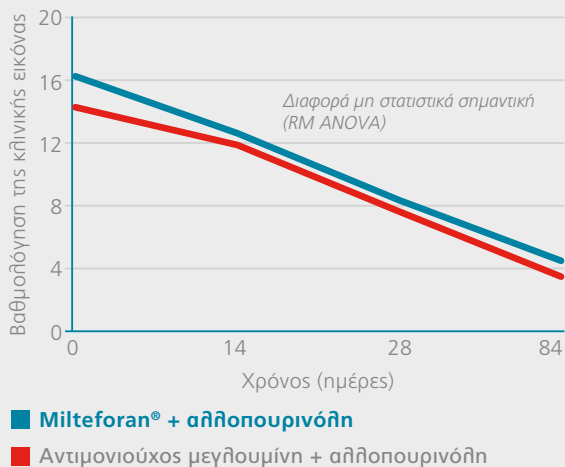
- Το μέσο ποσοστό μείωσης των κλινικών συμπτωμάτων μεταξύ H0 και H28 των σκύλων της ομάδας 1 ήταν 46.8% (95% IC: 36.8-56.7) ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την ομάδα 2 ήταν 41.3% (95% IC: 29.8-51.1).

Με μία θεραπεία 28 ημερών είτε με συνδυασμό Milteforan® και αλλοπουρινόλης ή αντιμονιούχου μεγλουμίνης και αλλοπουρινόλης αναμένεται κλινική βελτίωση που κυμαίνεται από 30% έως 50%.

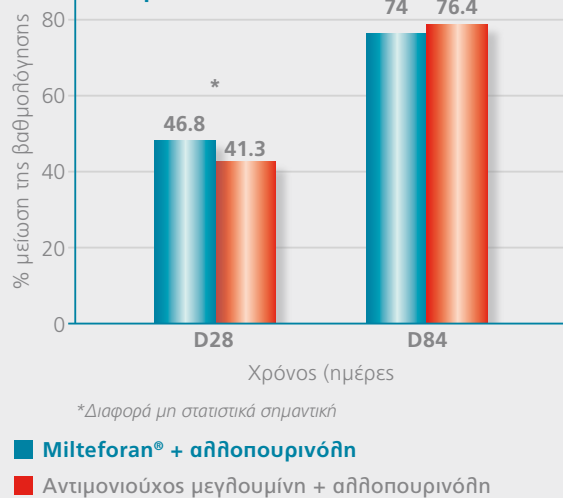
- Η στατιστική επεξεργασία (ANOVA) έδειξε ότι η κλινική εικόνα βελτιώθηκε σημαντικά με το χρόνο ($p < 0.0001$) και στις δύο ομάδες.

Η κλινική βελτίωση συνεχίστηκε πέραν του χρόνου θεραπείας των 28 ημερών, όπως απεικονίζεται από τη μείωση του μέσου όρου βαθμολογίας της κλινικής εικόνας με την πάροδο του χρόνου (Εικόνα 14) και το σημαντικό ποσοστό μείωσης της βαθμολογίας της κλινικής εικόνας τις ημέρες H28 και H84 (Εικόνα 15).

Εικόνα 14: Εξέλιξη του μέσου όρου της βαθμολογίας της κλινικής εικόνας σε σχέση με το χρόνο



Εικόνα 15: Ποσοστό % μείωσης της βαθμολογίας της κλινικής εικόνας σε σχέση με το χρόνο



Και στις δύο ομάδες παρατηρήθηκε βελτίωση για εκείνες τις παραμέτρους που σχετίζονται με την κλινική εικόνα της ΛΣ, όπως είναι η αύξηση του σωματικού βάρους, η μείωση του τίτλου των αντι-λεϊσμανιακών αντισωμάτων στον ορό του αίματος, η αποκατάσταση του λόγου αλβουμινών: σφαιρινών και η μείωση των επιπέδων των γ-σφαιρινών.

Και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική μείωση του παρασιτικού φορτίου μετά από 28 ημέρες θεραπείας:

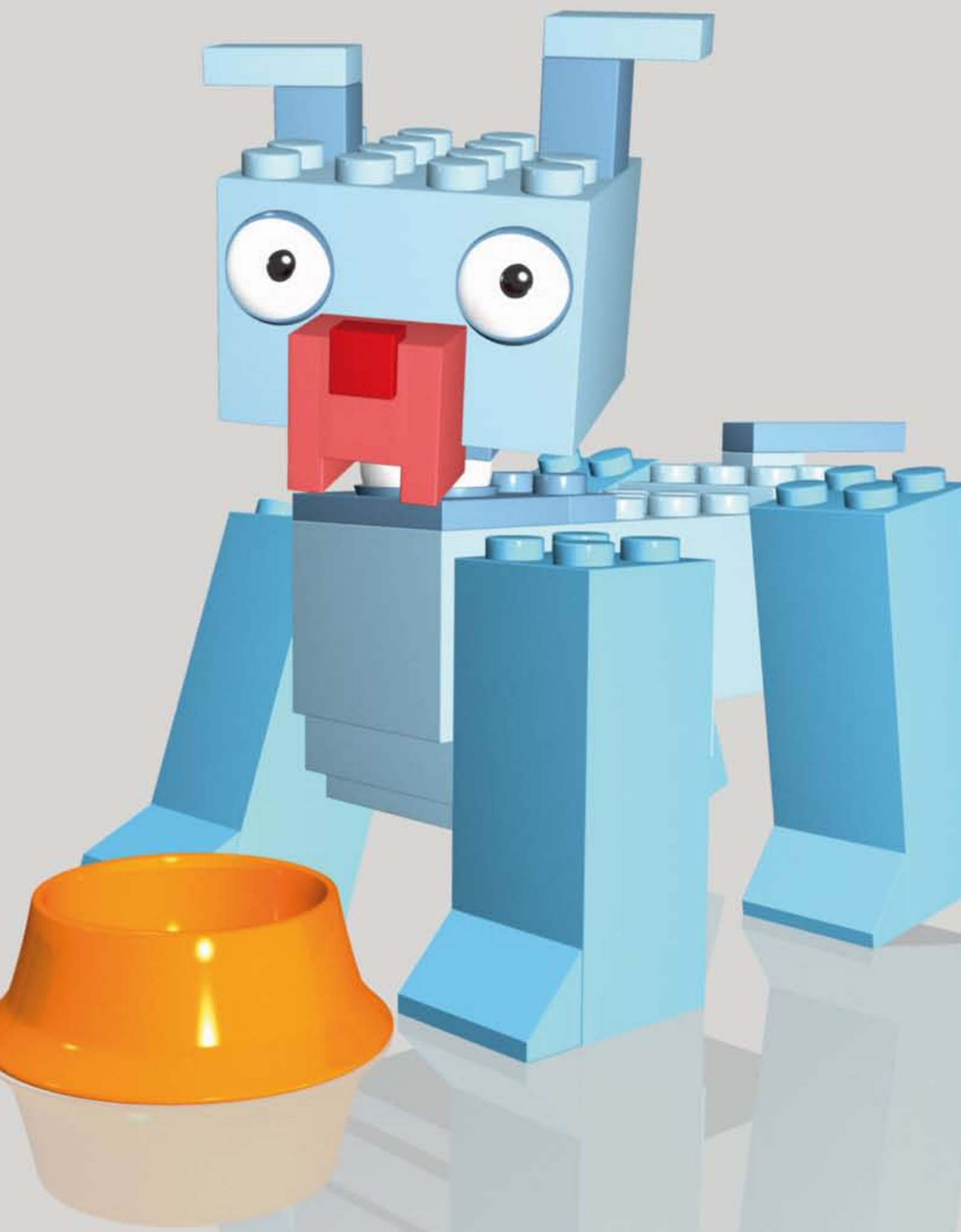
- Το 81.3% των σκύλων στους οποίους χορηγήθηκε ο συνδυασμός του Milteforan® και αλλοπουρινόλης (n=30) είχαν > 50% μείωση του παρασιτικού φορτίου την Η28 σύμφωνα με την RT-QPCR που έγινε στο μυελό των οστών.

Η ασφάλεια της συνδυασμένης αυτής θεραπείας έχει επιβεβαιωθεί.

Το συμπέρασμα σε αυτό το προκαταρκτικό στάδιο είναι ότι ο συνδυασμός του Milteforan® και της αλλοπουρινόλης αποτελεί μία εύκολη στη χρήση και εξίσου αποτελεσματική θεραπευτική επιλογή για τη ΛΣ συγκρινόμενη με το σύγχρονο θεραπευτικό πρωτόκολλο αναφοράς.

Περαιτέρω επανέλεγχος και RT-QPCR αναλύσεις βρίσκονται σε εξέλιξη.

Το Milteforan® σε συνδυασμό με την αλλοπουρινόλη είναι:
Ασφαλές χωρίς παρενέργειες
Αποτελεσματικό πρωτόκολλο
Η ΝΕΑ ΕΠΟΧΗ για τον έλεγχο της λεϊσμανίασης του σκύλου



4. Milteforan®: Εύκολη και άνετη χορήγηση από τον ιδιοκτήτη

4.1. Ευκολία στη χορήγηση

Το Milteforan® είναι το πρώτο κτηνιατρικό ιδιοσκεύασμα σε μορφή πόσιμου διαλύματος για τον έλεγχο της λείσμανιάσης του σκύλου. Σε σύγκριση με άλλες ενέσιμες θεραπευτικές επιλογές, αυτή η καινοτόμος και βολική φαρμακοτεχνική μορφή διευκολύνει τη χορήγηση του Milteforan® από τον ιδιοκτήτη του σκύλου με αποτέλεσμα την καλύτερη συμμόρφωσή του και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής του ζώου.



Οι κλινικές μελέτες στην πράξη απέδειξαν ότι το πόσιμο διάλυμα του Milteforan® ήταν καλώς ανεκτό από σκύλους όταν αναμειγνυόταν στην τροφή τους και ότι το 87.8% των ιδιοκτητών συμμορφώθηκε με τη διάρκεια θεραπείας των 28 ημερών.⁵⁰ Τα περιστατικά στα οποία δεν τηρήθηκε επακριβώς η θεραπεία των 28 ημερών, αφορούσαν στην πλειοψηφία τους σκύλους των οποίων οι ιδιοκτήτες διέκοψαν τη θεραπεία νωρίτερα εκ παραδρομής.

Οι πληροφορίες από τους ιδιοκτήτες που πήραν μέρος στις μελέτες ήταν πολύ θετικές. Τα αποτελέσματα από ένα ερωτηματολόγιο έδειξαν ότι:

- Το 89.5% των ιδιοκτητών βρήκε ότι το Milteforan® ήταν απλό και εύκολο στη χρήση του.
- Το 94.7% των ιδιοκτητών θα ήταν πρόθυμοι να ξαναχρησιμοποιήσουν το Milteforan® εάν απαιτηθεί και συνταγογραφηθεί από τον κτηνίατρό τους.

4.2. Χαρακτηριστικά του προϊόντος

Σύνθεση

Milteforan® 20 mg μιλτεφοσίνης/mL πόσιμο διάλυμα για σκύλους.

Περιέχει το ενεργό συστατικό:

Μιλτεφοσίνη 20 mg/mL.

Φαρμακοτεχνική μορφή

Διαυγές, άχρωμο παχύρευστο υδατικό διάλυμα.

Φύλαξη

Το Milteforan® θα πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάρκεια ζωής

Στην αρχική συσκευασία διάρκεια ζωής 3 έτη.

Το φιαλίδιο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μέσα σε 1 μήνα από την πρώτη χρήση.



Συνιστώμενη δόση και τρόπος χορήγησης

Το Milteforan® θα πρέπει να χορηγείται στη δόση των:

μιλτεφοσίνη 2 mg/kg Σ.Β από το στόμα, μία φορά ημερησίως για 28 ημέρες.

Αυτή η δόση αντιστοιχεί σε:

1 mL Milteforan® για κάθε 10 kg Σ.Β την ημέρα για 28 ημέρες.

Συνιστάται να αναμειγνύεται το Milteforan® με την τροφή σε ολόκληρο ή μέρος του γεύματος.

Επειδή το παράσιτο εντοπίζεται στους εν τω βάθει ιστούς (μυελός των οστών, λεμφογάγγλια, σπλήνας, ήπαρ) είναι καθοριστικής σημασίας η συμμόρφωση με τη διάρκεια θεραπείας των 28 ημερών για να διασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα του προϊόντος.

Το σωματικό βάρος του σκύλου θα πρέπει να υπολογιστεί επακριβώς πριν και κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η χορήγηση μικρότερης ποσότητας θα πρέπει να αποφεύγεται για να μειωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας από το παράσιτο η οποία μπορεί τελικά να καταλήξει σε αναποτελεσματική θεραπεία.

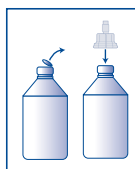
Ανεπιθύμητες παρενέργειες από το πεπτικό σύστημα, όπως έμετος και διάρροια, μπορεί να παρατηρηθούν εάν το φάρμακο χορηγείται στους σκύλους πάνω από τη συνιστώμενη δόση των 2 mg μιλτεφοσίνης/kg Σ.Β./ημερησίως.

Το Milteforan® θα πρέπει να χορηγείται στη δόση των 1 mL/kg Σ.Β, από το στόμα, μία φορά την ημέρα για 28 ημέρες.

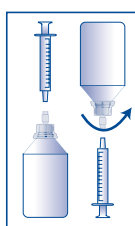


Οδηγίες χρήσης

Πριν από κάθε χρήση φορέστε προστατευτικά γάντια. Η άμεση επαφή με το δέρμα μπορεί να προκαλέσει δερματική αντίδραση.



Αφαιρέστε το προστατευτικό καπάκι, βιδώστε το εσώκλειστο ειδικά προσαρμοσμένο καπάκι ασφαλείας και αφήστε το μόνιμα στη θέση αυτή.



Α Κρατήστε το φιαλίδιο σε όρθια θέση.

Β Βιδώστε τη σύριγγα στο ειδικά προσαρμοσμένο καπάκι μέχρι να σταθεροποιηθεί.

Γ Αναποδογυρίστε με προσοχή το φιαλίδιο με τη σύριγγα και αναρροφήσετε τη συνι-

στώμενη ποσότητα.

Δ Επιστρέψτε το φιαλίδιο με τη σύριγγα σε όρθια θέση και αποσύρετε τη σύριγγα από το φιαλίδιο.



Αδειάστε τη συνιστώμενη ποσότητα στο φαγητό του σκύλου.



Τοποθετήστε την κενή σύριγγα στην αρχική συσκευασία. Μην ξεπλένετε τη σύριγγα.



Βγάλτε τα προστατευτικά γάντια και φυλάξτε τα στην αρχική συσκευασία.



Πλύνετε σχολαστικά τα χέρια σας.

Αντενδείξεις

Το Milteforan® δεν θα πρέπει να χορηγείται σε έγκυες, θηλάζουσες και σε ζώα αναπαραγωγής. Να μη χρησιμοποιείται σε περίπτωση υπερευαισθησίας στο ενεργό συστατικό ή σε οποιοδήποτε από τα έκδοχα.

Απόρριψη κτηνιατρικού προϊόντος

Κάθε μη χρησιμοποιημένο κτηνιατρικό προϊόν ή υπολείματά του πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία.

4.3. Ασφάλεια για τον ιδιοκτήτη του σκύλου που το χορηγεί

Ένας πλήρης υπολογισμός ασφάλειας έχει γίνει για το Milteforan® για να εξασφαλίσει την ασφάλεια του ιδιοκτήτη του σκύλου που χορηγεί το προϊόν. Η οξεία και χρόνια τοξικωση από το Milteforan® έχει μελετηθεί για τα πιθανά επίπεδα και διάρκεια έκθεσης στα οποία ο ιδιοκτήτης του σκύλου θα μπορούσε δυνητικά να έρθει σε επαφή με το προϊόν. Ο πλέον σοβαρός κίνδυνος για τον χρήστη σχετίζεται με την τερατογόνο και εμβρυοτοξική δράση της μιλτεφοσίνης. Είναι επομένως επιτακτική ανάγκη το προϊόν να μην χορηγείται στο σκύλο από:

- έγκυες γυναίκες
- γυναίκες που σχεδιάζουν να μείνουν έγκυες
- γυναίκες στις οποίες η κατάσταση εγκυμοσύνης είναι άγνωστη

Σε μελέτες που υπολογίζουν τους οφθαλμικούς και τους πρωτογενείς δείκτες ερεθισμού σε κουνέλια,^{60,61} παρατηρήθηκαν μέτριος οφθαλμικός και δερματικός ερεθισμός. Επομένως, συνιστάται η προσοχή κατά τον χειρισμό του Milteforan® για την αποφυγή επαφής με το προϊόν όσο το δυνατόν περισσότερο.

Ο δυνητικός κίνδυνος έκθεσης του δέρματος ή των οφθαλμών για το χρήστη είναι μικρός. Παρόλα αυτά, οι ακόλουθες προφυλάξεις έχουν ληφθεί για την αποφυγή επαφής του δέρματος ή των οφθαλμών:

- Το Milteforan® είναι συσκευασμένο σε άθραυστα PET φιαλίδια
- Το Milteforan® πόσιμο διάλυμα είναι παχύρευστο για να μειωθεί ο κίνδυνος πιτσιλίσματος.
- Το φιαλίδιο είναι κλεισμένο σε κενό με πλαστικό πώμα και σφραγισμένο με κάλυμμα αλουμινίου για την αποφυγή διαρροής του προϊόντος.
- Η ιατρική συσκευή είναι προσαρμοσμένη έτσι ώστε η σύριγγα πρέπει να διδωθεί πάνω και μόνο μία περιορισμένη ποσότητα μιλτεφοσίνης μπορεί να αντληθεί (max 3 mL)
- Το Milteforan® δεν χρειάζεται να χορηγηθεί άμεσα στο στόμα του σκύλου. Χορηγείται με την τροφή.
- Μία ειδική θήκη στη συσκευασία επιτρέπει την ασφαλή φύλαξη της σύριγγας στο κουτί
- Παρέχονται προστατευτικά γάντια για την αποφυγή επαφής του δέρματος.
- Συνιστάται η χρήση προστατευτικών γυαλιών για τα μάτια κατά τον χειρισμό του Milteforan®.

Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα ή τους οφθαλμούς, συνιστάται το άμεσο πλύσιμο της περιοχής με άφθονο νερό και επικοινωνία με ιατρό.

**Το Milteforan® είναι ειδικά
συσκευασμένο για την εξασφάλιση
της ασφάλειας του χρήστη**



5. Milteforan®: συμπεράσματα



Βιβλιογραφία

1. Achterberg V, Gercken G. Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1987; 23:117-122.
2. Achterberg V, Gercken G. Metabolism of ether lysophospholipids in *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1987; 26:277-287.
3. Agrawal S, Rai M, Sundar S. Management of visceral leishmaniasis: Indian perspective. *Journal of Postgraduate Medicine*, 2005; 51(5):53-57.
4. Amusatégui I, Sainz A, Aguirre E, Tesouro MA. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of Leishmaniasis. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1026:154-7.
5. Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 2002; 106:315-324.
6. Berman J. Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacotherapeutics*, 2005; 6(8):1381-1388.
7. Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, Genchi C, Gradoni L, Gramiccia M, Maroli M, Mortarino M, Pietrobelli M, Rossi L, Ruggiero M. Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parassitologia*, 2004; 46(1-2):193-197.
8. Cardoso L, Rodrigues M, Santos H, Schoone GJ, Carreta P, Varejao E, Van Benthem B, Afonso MO, Alves-Pires C, Semio-Santos SJ, Rodrigues J, Schallig HD. Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology*, 2004; 121(1-2):21-32.
9. Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N, Rodrigues M. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop*, 2004; 91(2):95-100.
10. Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*, 1987; 36:2633-2636.
11. Croft SL, Neal RA, Thornton EA, Hermann DBJ. Antileishmanial activity of the ether phospholipids ilmofosine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993; 87:217-219.
12. Croft SL, Snowden D, Yardley V. The activities of four anticancer alkylphospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1996; 38:1041-1047.
13. Dedet JP. Les Leishmanioses: tendances actuelles. *Proceedings of the Mondial Vet Lyon*, 1999.
14. Dedet JP, Pratlong F. Point épidémiologique sur les foyers d'endémie leishmanienne en Europe. *Journée d'actualités Leishmaniose*, 2006.
15. Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica*, 2002; 81(2):151-157.
16. Escobar P, Yardley V, Croft SL. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentosan) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001; 45:1872-1875.
17. Ferroglio E, Maroli M, Gastaldo S, Mignone W, Rossi L. Canine leishmaniasis, Italy. *Emerg Infect Dis*, 2005; 11(10):1618-20.
18. Ferroglio E, Romano A, Passera S, D'Angelo A, Guiso P, Ghiggi E, Bolla C, Trisciuglio A, Biglino A. Dogs' parasite and zoonotic risk: from old to new "emergencies" in the North-West of Italy. *Parassitologia*, 2006; 48(1-2):115-6.
19. Gramiccia M *et al.* Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime®) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1992; 86(6):613-620.
20. Killick-Kendrick R. Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona, Spain 1999.
21. Killick-Kendrick R. Leishmaniasis: the vector. *Proceedings of the Mondial Vet Lyon*, 1999.
22. Klenner T, Beckers T, Nooter K, Holtmann H. Influence of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) on cytokine synthesis and biological responses, *In: Adv Exp Med Bio.* Platelet-activating factor and related lipid mediators, 2nd edition, Plenum Press, New York, 1996; 181-187.
23. Kontos V. Leishmaniasis: update in Greece. *Proceedings of the Mondial Vet Lyon*, 1999.

24. Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral Leishmaniasis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992; 36:1630-1634.
25. Le Fichoux Y, Rousseau D, Ferrua B *et al.* Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998; 42:654-658.
26. Legrand JJ, CIT Expert Report : Assessment of the potential toxicity of a combination of allopurinol and miltefosine as an oral treatment against canine leishmaniasis, 13 November 2006.
27. Lira R, Contreras LM, Santa Rita RM, Urbina JA. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001; 47:537-546.
28. Lux H, Hart DT, Parker PJ, Klenner T. Ether-lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkyl phospholipids analogues. *Advances in Experimental and Medical Biology*, 1996; 416:201-211.
29. Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdos FR. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2000; 111:1-14.
30. Miro G, Oliva G, Mortarino M, Cruz I, Cañavate C, Vischer C, Bianciardi P. Comparative clinical efficacy and safety of miltefosine-allopurinol versus meglumine antimoniate-allopurinol in the treatment of canine leishmaniasis: preliminary results of a multi-centric, controlled field study, *Southern European Veterinary Conference*, Barcelona, Spain, October 2007.
31. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, 2002; 18(9):399-405.
32. Murray HW. Suppression of post-treatment recurrence of experimental visceral leishmaniasis in T-cell deficient mice by oral miltefosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000; 44:3235-3236.
33. Murray HW, Delph-Etienne S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanism. *Journal of Infectious Diseases*, 2000; 181:795-799.
34. Noli C. Canine leishmaniasis – a new danger for British dogs: How to recognise and treat it. *UK Vet*, 2006; 11:66-70.
35. Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology*, 2005; 16 (4):213-232.
36. Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol*, 2006; 44(4):1318-22.
37. Page SW, Antiparasitic drugs, *In: Small Animal Clinical Pharmacology*, WB Saunders 2002; Chapter 9: p.165.
38. Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiotou A, Bobojanni C, Antoniadou G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in northwestern Greece. *J Infect*, 2005; 50(1):53-60.
39. Paradies P, Capelli G, Cafarchia C, De Caprariis D, Sasanelli M, Otranto D. Incidences of canine leishmaniasis in an endemic area of southern Italy. *J Vet Med Infect Dis Vet Public Health*, 2006; 53(6):295-8.
40. Riera C. Observations on “seroepidemiology study of *Leishmania infantum* infection in Castilla-Leon, Spain. *Am J Trop Med Hyg*, 2005; 73(2):231.
41. Rosenthal E, Marty P. Les leishmanioses viscérales. *La Revue du Practicien*, 2004; 54:2211-2216.
42. Roze M. Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *EJCAP*, 2005; 15(1):39-52.
43. Saló i Mur E. Leishmaniasis: Actuality in Spain. *Proceedings of the Mondial Vet Lyon*, 1999.
44. Semiao-Santos S. Leishmaniasis: update in Portugal. *Proceedings of the Mondial Vet Lyon*, 1999.
45. Solano-Gallego L, Lull J, Ramis A, Fernandez-Bellon H, Rodriguez A, Ferrer L, Alberola J. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. *Am J trop Med Hyg*, 2005; 72(6):815-8.
46. Toutain PL, Expert Report: Study of the pharmacokinetics of miltefosine in plasma, urine and faeces of dogs after oral repeated administrations of miltefosine in food for 28 days: Pharmacokinetic Analysis Report, March 2006.
47. Unger C, Maniera T, Kaufman-Kolle P, Eibl H. *In vivo* antileishmanial activity of hexadecylphosphocholine and other alkylphosphocholines. *Drugs of Today*, 1998; 34 (suppl. F):133-140.

48. Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004; 48(8):3010-3015.
49. Vischer C, Grousseau D, Médaille C. Preliminary safety study of the combination therapy of miltefosine and allopurinol in dogs. *32nd World Small Animal Veterinary Conference*, Sydney, Australia, August 2007.
50. Woerly V, Maynard L, Sanquer A, Médaille C. Clinical efficacy of a miltefosine oral solution in the treatment of canine leishmaniasis. *31st World Small Animal Veterinary Conference*, Prague, Czech Republic, October 2006.
51. Virbac Data On File.
52. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.000000-40020
53. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.000000-40025
54. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. 107.00/0005
55. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.010000-60010
56. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.000000-40027
57. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.010000-60008
58. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.01/60002
59. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.010000-40005
60. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.010000-40007
61. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.010000-40008
62. Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.00/60001

