

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

## Parte I: Approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico

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

#### Part I: Diagnostic approach and classification of the patient affected by leishmaniasis and management of dogs with proteinuria

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

L'attività del GSLC viene supportata da HILL'S Italia.

- Prof. MASSIMO CASTAGNARO** - DVM, PhD, Dipl ECVP, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università di Padova, Viale dell'Università 16, Legnaro (PD) (I)
- Dr. ALBERTO CROTTI** - DVM, Studio Veterinario Associato, Via P. Revelli Beaumont 43, 16143, Genova (I)
- Dr. ALESSANDRA FONDATI** - DVM, PhD, Dipl ECVD, libero professionista, Roma (I)
- Dr. LUIGI GRADONI** - BSc, PhD, Dirigente di Ricerca, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Reparto di Malattie trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, 00161 Roma (I)
- Prof. GEORGE LUBAS** - DVM, Dipl. ECVIM-CA Internal Medicine, Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa, V.le Piaggio 2, 56124 Pisa (I)
- Dr. MICHELE MAROLI** - BSc, PhD, Dirigente di Ricerca, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Reparto di Malattie trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, 00161 Roma (I)
- Prof. GAETANO OLIVA** - DVM, Ordinario di Clinica Medica Veterinaria, Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università di Napoli Federico II, Via Federico Delpino 1, 80137 Napoli (I)
- Prof. SAVERIO PALTRINIERI** - DVM, PhD, Dipl. ECVC, Dipartimento di Patologia Animale Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano, Via Celoria 10, 20133, Milano (I)
- Dr. LAIA SOLANO-GALLEGO** - DVM, PhD, Dipl ECVC, Clinica Veterinaria Privata S. Marco, Padova (I)
- Dr. XAVIER ROURA** - DVM - PhD, Dipl ECVIM-CA, Servei de Medicina Interna, Hospital Clínic Veterinari, Facultat de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, Spagna (E)
- Dr. ANDREA ZATELLI** - DVM - Clinica Veterinaria Pirani, Via Majakowski 2/L,M,N - 42100 Reggio Emilia (I)
- Dr. ERIC ZINI** - DVM - PhD, Dipl ECVIM-CA, Clinic for Small Animal Internal Medicine, University of Zurich, Winterthurerstrasse 260, 8057 Zurich, Svizzera (CH)

### Riassunto

Le linee guida su approccio diagnostico, classificazione e gestione del paziente leishmaniotico proteinurico, elaborate dal "Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina" (G.S.L.C.) sono basate sulla letteratura scientifica internazionale, e dove questa è carente, sull'esperienza dei partecipanti al G.S.L.C. Questo documento ha lo scopo di descrivere l'approccio ideale e più completo alla malattia anche se queste linee guida non devono sostituirsi al giudizio del clinico il quale, soprattutto in una malattia complessa quale la leishmaniosi, deve valutarne l'applicabilità o modularle caso per caso.

Il paziente con segni clinici e/o alterazioni di laboratorio compatibili con leishmaniosi (lesioni cutanee o oculari, linfadenopatia, zoppia, anemia, disprotidemie, iperazotemia, proteinuria) deve essere considerato *malato* se il parassita è evidenziabile citologicamente nelle lesioni e/o il titolo anticorpale è 4 volte superiore al limite di positività del laboratorio di riferimento. Se il titolo anticorpale è medio-basso e l'esame citologico negativo, vanno eseguiti esami istologici/immunoistochimici (sulle lesioni cutanee) o PCR su midollo e/o linfonodo. Se solamente quest'ultimo esame risulta positivo il soggetto deve essere considerato *infetto* e, anche malato, solo nel caso emerga una chiara correlazione tra la positività e la lesione. Se anche la PCR risulta negativa il soggetto va considerato *esposto* e monitorato sierologicamente.

La proteinuria deve essere quantificata mediante il rapporto proteine/creatinina urinario (PU/CU). Dato che il grado di proteinuria si associa alla possibilità di sviluppare insufficienza renale, è importante non solo instaurare una terapia anti-*Leishmania* ma anche contrastare la proteinuria. A tale scopo possono essere utilizzati diversi farmaci, tra i quali gli ACE-inibitori. Infine, è necessario modificare la dieta, soprattutto nei soggetti con contemporanea insufficienza renale.

## Summary

The "Canine Leishmaniasis Working Group" (C.L.W.G.) has elaborated guidelines for the diagnosis of canine leishmaniasis, its classification and the treatment of affected dogs with concurrent proteinuria. The guidelines are based on existing references and/or the experience of the C.L.W.G. members. The paper aims to provide the most updated information about the treatment of dogs affected by leishmaniasis. The veterinary clinician should critically evaluate the potential applicability of the present guidelines when treating cases of canine leishmaniasis.

A dog with clinical signs and/or laboratory findings compatible with leishmaniasis (skin or ocular lesion, lymphadenopathy, lameness, anemia, dysproteinemia, azotemia, proteinuria) is considered affected if the parasite is identified within lesions on cytology and/or there is a fourfold increase of the antibody titre above what is considered the lower positive level of the reference laboratory. If the antibody titer is mildly to moderately increased, and cytological specimens are negative, it will be necessary to perform histology/immunohistology (on skin lesions) or PCR on bone marrow and/or lymph node samples. If one of the previous tests is positive the dog must be considered infected. If a clear association can be made with such lesions the dog is likely affected by leishmaniasis. When PCR is negative this indicates that the dog has been exposed to the parasite and should be serologically monitored.

Proteinuria should be quantified by the urine protein/creatinine urinary ratio (UP/UC). Because proteinuria is associated with the development of renal failure, it is important not only to treat the parasite but also to treat renal protein loss in dogs affected by leishmaniasis. ACE-inhibitors can be used for this purpose. In dogs with concurrent renal failure it is necessary to modify the diet.

## INTRODUZIONE

La leishmaniosi canina (LCan) è causata da *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), un protozoo caratterizzato dalla presenza di un evidente organello mitocondriale detto kinetoplasto. Le forme flagellate del parassita, dette promastigoti, si moltiplicano nell'intestino dell'insetto vettore, la femmina del flebotomo (*Diptera: Psychodidae*), che le inocula nella sede intradermica dell'ospite durante il pasto di sangue. I macrofagi del connettivo fagocitano i promastigoti, i quali assumono forma tondeggiante e non flagellata, e vengono chiamati amastigoti. Gli amastigoti, replicandosi nei macrofagi, li distruggono ed infettano progressivamente un numero sempre maggiore di fagociti. La disseminazione del parassita nell'organismo e l'eventuale sviluppo della malattia dipendono dal tipo e dall'efficienza della risposta immunitaria del cane infetto. Nei focolai di LCan del Mediterraneo le prevalenze d'infezione variano tra 2 e 40%. Gli studi sulla presenza d'immunità *Leishmania*-specifico cellulo-mediata hanno evidenziato prevalenze più alte, a suggerire che il tasso d'esposizione è probabilmente molto più elevato.<sup>1,3</sup> Nei focolai endemici del bacino del Mediterraneo i principali flebotomi vettori appartengono alle specie *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus* e *P. tobbi*<sup>4,11</sup>, tutte ad attività crepuscolare e notturna che si estende dalla tarda primavera al tardo autunno.

Dal punto di vista epidemiologico, fino agli anni '80 tutte le regioni del nord Italia, esclusi alcuni territori della provincia di Bologna, erano indenni da LCan.<sup>12</sup> A partire dagli inizi degli anni '90, si è verificato un aumento dell'incidenza di LCan in tutte le regioni endemiche e sono stati segnalati microfocolai di tipo stabile anche in aree tradizionalmente non endemiche, quali quelle del Piemonte, Valle d'Aosta, Lombardia, Trentino-Alto Adige, Veneto e Friuli Venezia Giulia.<sup>13,14</sup> Sembrerebbe quindi che l'endemia di LCan in Italia sia in rapida espansione verso latitudini settentrionali, costituendo per queste aree un problema emergente di sanità veterinaria.

Le infezioni da *Leishmania* hanno tre caratteristiche patogenetiche: (i) il bersaglio del parassita è rappresentato dai macrofagi, all'interno dei quali il parassita si può replicare; (ii) la comparsa e l'evoluzione della malattia dipendono dalla risposta immunitaria o infiammatoria dell'ospite; (iii) la persistenza dell'infezione nei tessuti. *Leishmania* tende a localizzarsi in tutti i tessuti più ricchi di elementi del sistema monocito-macrofagico, dove può essere rilevabile con metodi diretti già qualche settimana dopo l'infezione. Una certa percentuale di soggetti infetti può negativizzarsi ad alcuni dei test diagnostici, dopo un periodo generalmente breve dal primo riscontro positivo e senza aver ricevuto alcuna terapia. Non è noto, in realtà, se questi soggetti si siano liberati dell'infezione, abbiano contenuto l'infezione ad un livello tale che essa non risulti più rilevabile con il metodo utilizzato o se il parassita si sia localizzato in tessuti diversi da quelli esaminati in sede di prima diagnosi.<sup>15</sup> Nei mammiferi, *L. infantum* causa infezione, generalmente cronica, che a volte può essere asintomatica e a volte può evolvere in malattia sintomatica evidente: la risposta immunitaria gioca un ruolo molto importante in questa dicotomia (infezione *versus* malattia), grazie ai linfociti T helper CD4+ che possono indirizzare il sistema immunitario verso una risposta umorale (Th2), o verso una risposta cellulo-mediata (Th1). I due estremi dell'espressione clinica sono rappresentati da: (i) cani infetti e clinicamente sani, caratterizzati da una lieve o assente risposta Th2 e dalla presenza di una risposta Th1 specifica contro *Leishmania*; (ii) cani infetti e gravemente malati, caratterizzati da un'esagerata risposta Th2 e da una risposta Th1 assente o lieve.<sup>16</sup>

Nel cane e nell'uomo, la resistenza alla malattia sembra essere associata ad una risposta immunitaria di tipo misto Th1-Th2, con predominanza di citochine Th1, e la suscettibilità alla malattia ad una ridotta produzione di citochine, prevalentemente di tipo Th2.<sup>16-21</sup> In questi ultimi soggetti la continua stimolazione antigenica e l'esagerata risposta anticorpale inducono ipergammaglobulinemia, deposizione di immunocomplessi che possono provocare

glomerulonefrite, vasculite, poliartrite, uveite e meningite e produzione di autoanticorpi contro le piastrine e gli eritrociti.<sup>19</sup> Inoltre, i cani malati o asintomatici con una predominante risposta umorale si caratterizzano per una disseminazione del parassita nell'organismo, per una riduzione della conta dei linfociti T CD4+ e per la presenza di immunosoppressione.<sup>19,22</sup> La conta dei linfociti T CD4+ si correla inversamente, mentre il tasso di sieropositività si correla direttamente all'infettività dei flebotomi.<sup>23,24</sup>

Nel novembre 2005 è stato costituito il "Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina" (G.S.L.C.) [vedi sito Web: <http://www.gruppoleishmania.org/>] con lo scopo di ottenere un razionale ed omogeneo approccio alla gestione del paziente canino leishmaniotico per quanto riguarda:

1. l'approccio diagnostico;
2. la classificazione del paziente leishmaniotico;
3. l'approccio terapeutico;
4. la gestione del paziente leishmaniotico proteinurico;
5. il protocollo gestionale di prevenzione.

Nelle linee guida qui presentate sono considerati l'approccio diagnostico, la classificazione e la gestione del paziente leishmaniotico proteinurico. Tali linee guida sono basate sulla letteratura scientifica internazionale e, dove questa è carente o incompleta, sulle esperienze dei partecipanti al GSLC. Queste linee guida, indirizzate al Medico Veterinario, descrivono l'approccio ideale e più completo alla malattia, e vanno interpretate come raccomandazioni da seguire per migliorare le potenzialità diagnostiche, terapeutiche, di gestione e prevenzione senza sostituirsi al giudizio del clinico, il quale, soprattutto in una malattia complessa quale la leishmaniosi, deve valutare caso per caso la loro applicabilità e/o modularle sulla base delle diverse situazioni epidemiologiche e cliniche.

## 1. APPROCCIO DIAGNOSTICO

[a cura di Paltrinieri S (coordinatore), Castagnaro M, Crotti A, Fondati A, Gradoni L, Lubas G, Solano Gallego L, Zatelli A]

La diagnosi di LCan deve essere basata su un approccio integrato che tenga in considerazione segnalamento, anamnesi, reperti fisici, alterazioni clinico-patologiche, e risultati dei test di diagnosi eziologica diretti ed indiretti.

### 1.1. Segnalamento e anamnesi

Sebbene la leishmaniosi possa verificarsi in tutte le razze canine alcune, come ad esempio Pastore tedesco e Boxer, sembrano essere predisposte.<sup>(25,26)</sup> Potrebbe inoltre esistere una predisposizione di sesso per i maschi che presentano un maggiore rischio di sviluppare la malattia,<sup>27,28</sup> come descritto nella specie umana<sup>29</sup> e nel criceto.<sup>30</sup> Inoltre, la malattia ha una distribuzione bimodale, con un picco nei soggetti di età inferiore a 3 anni e un secondo picco tra gli 8 e i 10 anni<sup>19</sup> ed è di fondamentale importanza sapere se il cane vive o ha soggiornato in aree endemiche e/o se è esposto ai vettori, se ha ricevuto trattamenti preventivi potenzialmente efficaci contro i flebotomi o terapie in grado di interferire con l'efficienza del suo sistema immunitario. La raccolta anamnestica si completa con le informazioni riguardanti i segni clinici rilevati dal proprietario, compati-

bili con LCan, tra cui dimagrimento, astenia, alterazioni cutanee, poliuria-polidipsia (PU/PD) ed epistassi.

### 1.2. Esame fisico e diagnostica per immagini

I segni clinici più frequentemente rilevabili in corso di LCan sono quelli cutanei e la linfadenopatia. È però potenzialmente rilevabile una gamma vasta ed eterogenea di segni clinici e lesioni<sup>31-34</sup> [vedi Box 1], alcuni dei quali (ad es., epato-splenomegalia, lesioni renali) rilevabili anche tramite diagnostica per immagini. In funzione del segnalamento e dell'anamnesi il clinico deciderà dove inserire la malattia, in ordine di probabilità, nella sua lista di diagnosi differenziali. In ogni caso, se i segni clinici permettono di includere la leishmaniosi tra le diagnosi differenziali, è consigliabile eseguire le indagini di laboratorio [vedi 1.3.] per escluderne-confermarne la presenza.

### 1.3. Esami di laboratorio d'elezione e reperti compatibili con leishmaniosi

Gli esami di laboratorio di base sono l'esame emocromocitometrico, il profilo biochimico sierico, l'elettroforesi delle sieroproteine e l'esame delle urine. In corso di LCan, tali esami possono permettere di rilevare una o più alterazioni

BOX 1 Reperti clinici generali e specifici di particolari distretti dell'organismo in corso di LCan	
<b>Generali</b>	Stato di nutrizione scadente fino alla cachessia Ipotrofia muscolare Letargia Pallore delle mucose Epistassi Aumento di volume da lieve a moderato dei linfonodi esplorabili Epistassi Epato-splenomegalia Zoppie e tumefazioni articolari Febbre
<b>Cutanei e mucocutanei</b>	Dermatite desquamativa (localizzata/generalizzata) Dermatite ulcerativa con aspetto e distribuzione variabili Giunzioni muco-cutanee Cute che ricopre le estremità Sedi sottoposte a trauma Dermatite papulare Dermatite nodulare Lesioni nasali simil-lupus/pemfigo Onicopatie Ipercheratosi naso-digitale
<b>Oculari</b>	Lesioni palpebrali: vedi reperti cutanei e mucocutanei Lesioni congiuntivali diffuse e/o nodulari. Lesioni corneali per lo più associate a quelle congiuntivali (cheratocongiuntivite). Presenti anche forme di cheratite nodulare e di cheratocongiuntivite secca. Lesioni della sclera: episclerite e sclerite diffusa e/o nodulare. Lesioni dell'uvea anteriore diffuse e/o granulomatose e lesioni dell'uvea posteriore (corioretiniti, emorragie e distacchi retinici). Possibili complicanze delle forme uveali, il glaucoma e la panoftalmite. Lesioni orbitali granulomatose, miositi dei muscoli estrinseci.
<b>Altri</b>	Gastrointestinali, neurologici, ecc.

**BOX 2**  
**Rilievi compatibili con LCan negli esami di laboratorio di base e di approfondimento**

Esami di base	Riscontri compatibili con leishmaniosi	Esami di approfondimento
<b>Emocromocitometrico</b>	Anemia scarsamente o non rigenerativa Possibile anemia rigenerativa (per processi immunomediati) Leucocitosi neutrofila e monocitaria con linfopenia ed eosinopenia (leucogramma da stress/infiammazione) Leucopenia Eventuale trombocitopenia	Citofluorimetria per la ricerca di anticorpi antieritrociti  Esame citologico del midollo osseo Profilo coagulativo completo (ad es., aumento FDP* e decremento AT*) Ricerca coinfezioni (ad es. da <i>Ehrlichia canis</i> ) Citofluorimetria per la ricerca di anticorpi antiplastrine
<b>Profilo coagulativo di base</b>	Iperfibrinogenemia, possibile allungamento PT e aPTT	Profilo coagulativo completo (come sopra)
<b>Profilo biochimico</b>	Iperproteinemia, ipoalbuminemia, iperglobulinemia, alterato rapporto Albumine/Globuline Azotemia (valori elevati di urea [BUN] e creatinina sierici)  Aumento degli enzimi epatici	Proteine di fase acuta: CRP*, Hp*, SAA* (utili per il monitoraggio) Parametri lipidici (ipercolesterolemia) Elettroliti (ipokaliemia) Minerali Ca/P, Mg (iperfosforemia/iper magnesemia) Emogasanalisi (acidosi metabolica) Test di funzionalità epatica
<b>Elettroforesi delle sieroproteine</b>	Ipoalbuminemia, Aumento di globuline $\alpha_2$ e gammopatia poli/oligoclonale	Proteine di fase acuta: CRP*, Hp*, SAA* (utili per il monitoraggio)
<b>Analisi delle urine</b>	Urine isostenuriche (PS*:1008-1012) o scarsamente concentrate (<1030) Proteinuria (determinata con strisce reattive e PU/CU*)	SDS-AGE* urine (compatibile con leishmaniosi: proteinuria glomerulare o mista)

\* FDP=prodotti di degradazione di fibrina/fibrinogeno; AT=antitrombina III; CRP=Proteina C reattiva; Hp=aptoglobina; SAA= siero-amiloide A; PS=peso specifico; PU/CU=rapporto proteine/creatinina urinarie; SDS-AGE= elettroforesi in gel d'agarosio-sodiododecilsolfato.

tra quelle riportate nel Box 2.<sup>31-34</sup> Sulla base dei riscontri rilevati negli esami di base possono essere eseguiti esami di approfondimento, anch'essi riportati nel Box 2.<sup>35-37</sup>

## 1.4. Diagnosi eziologica

Per identificare il parassita o la risposta dell'organismo contro di esso devono essere integrati tra loro diversi metodi di diagnosi eziologica. La positività del midollo o degli organi linfoidi, infatti, non è sempre indice di infezione persistente, né tantomeno permette di ascrivere a *Leishmania* gli eventuali segni clinici rilevati. Al contrario, l'identificazione del parassita all'interno di organi che presentino lesioni compatibili con leishmaniosi permette di stabilire con buona probabilità una relazione causa-effetto tra parassita e lesioni.

I metodi diagnostici attualmente disponibili [cito-istologici, parassitologici, molecolari, sierologici e di valutazione della risposta cellulare] sono descritti di seguito. Si ricorda che è opportuno chiedere al laboratorio quali sono le norme più opportune per il prelievo, la conservazione e l'invio dei campioni.

### 1.4.1 Metodi cito-istologici

**Esame citologico.** Il metodo permette di evidenziare la presenza di amastigoti all'interno di macrofagi intraliesionali o in sede extracellulare. Nel caso il campionamento avvenga a livello di organi lesionati si osservano alterazioni citologiche (flogosi linfoplasmacellulare e/o granulomatoso-piogranulomatosa, iperplasia reattiva linfonodale, iperplasia mieloide e/o ipoplasia eritroide nel midollo osseo,

ecc.) compatibili con leishmaniosi. L'indagine citologica andrebbe quindi eseguita sui seguenti campioni:

- (i) lesioni cutanee papulari, nodulari e ulcerative: prelievo mediante ago-infissione (o ago-aspirazione) e/o apposizione; le lesioni ulcerative di natura ischemica possono, però, risultare negative;
- (ii) midollo osseo e linfonodi in presenza di segni clinici o alterazioni clinico-patologiche riferibili ad un loro interessamento (anemia, linfadenomegalia, ecc.);
- (iii) altre sedi: fluidi biologici prelevabili da sedi con lesioni (ad es. liquido sinoviale in caso di artrite/poliartrite, liquido cefalorachidiano in caso di segni neurologici, ecc.).

In assenza di lesioni campionabili, gli organi o tessuti in cui più facilmente si possono riscontrare parassiti sono rappresentati, in ordine decrescente di sensibilità diagnostica, da midollo osseo, linfonodo e milza, sangue.<sup>38-39</sup> Il materiale raccolto per la citologia può anche essere conservato ed inviato al laboratorio, in caso di risultato citologico negativo, per eseguire la ricerca del genoma di *Leishmania* mediante PCR (vedi oltre).

**Esame istologico.** Il parassita può essere evidenziato in sezioni allestite da lesioni colorate routinariamente con ematossilina-eosina. In associazione al parassita, possono essere anche evidenziate le alterazioni compatibili con LCan, rappresentate da infiammazioni linfoplasmacellulari o granulomatoso-piogranulomatose e/o vasculiti a carico di diversi organi, dermatopatie ischemiche, dermatiti linfoplasmacellulari dell'unione dermo-epiteliale, iperplasia linfoide a carico di milza e linfonodi. Il ricorso all'esame istologico è sempre consigliabile quando, nonostante un esame citologico negativo, permane il forte sospetto di

LCan, soprattutto in presenza di dermatiti e nelle forme cutanee caratterizzate da lesioni focali.

Nel caso si rilevino alterazioni istologiche quali quelle sopra descritte, ma non fosse possibile identificare il parassita in sezioni colorate con ematossilina-eosina, sarà opportuno procedere con colorazioni immunoistochimiche utilizzando anticorpi diretti contro antigeni di *Leishmania*. Qualora anche questo approccio risulti negativo, il campione biotico può essere utilizzato per la ricerca del genoma di *Leishmania* mediante PCR (vedi oltre).<sup>40,41</sup>

### 1.4.2 Metodi parassitologici

**Esame colturale.** È il test più specifico perché lo sviluppo in coltura di promastigoti vitali è unicamente ascrivibile al genere *Leishmania* qualora si tratti di campioni prelevati in aree endemiche del Vecchio Mondo. Ha però lo svantaggio di richiedere tempi lunghi d'esecuzione ed è eseguito solo presso laboratori specializzati di alcuni Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

**Xenodiagnosi.** Il metodo consiste nel far nutrire sul cane sospetto un certo numero di flebotomi allevati in laboratorio che sono poi esaminati alcuni giorni dopo per la presenza di promastigoti nel tratto intestinale. Il metodo è molto sensibile ma, ovviamente, di scarsa applicabilità pratica.

### 1.4.3 Metodi molecolari

**Polymerase chain reaction (PCR).** La tecnica permette di amplificare sequenze specifiche del genoma di *Leishmania*. È un metodo molto sensibile, soprattutto se va ad amplificare sequenze genomiche "multicopia", presenti cioè in numero elevato in ogni singolo parassita, quali il DNA dei minicircoli del kinetoplasto.<sup>42</sup> È quindi in grado di identificare piccolissime quantità di DNA dei protozoi presenti nel materiale biologico esaminato. Le tre tecniche più utilizzate sono:

**(i) PCR convenzionale o tradizionale:** Il DNA di *Leishmania* è amplificato usando una coppia di primers (sequenze di basi complementari alla sequenza bersaglio contenuta nel DNA di *Leishmania*);<sup>41-45</sup>

**(ii) PCR "Nested":** una modificazione della PCR tradizionale, più sensibile ma meno specifica, in quanto aumentando il numero di passaggi, tende ad aumentare il rischio di contaminazione da parte di DNA estraneo e, quindi, di risultati falsi positivi;<sup>43,46</sup>

**(iii) PCR quantitativa ("real-time"):** grazie all'utilizzo di sonde fluorescenti, è possibile quantificare il numero di copie di DNA presenti nel campione biologico. Ha una sensibilità simile alla PCR "Nested", ma se eseguita con sistemi "chiusi" è più specifica perché il campione subisce un numero minore di manipolazioni ed è quindi meno soggetto a contaminazioni. Secondo dati preliminari recentemente pubblicati,<sup>47</sup> può inoltre fornire informazioni (ad es., numero di parassiti presenti) utili in fase di monitoraggio, per cui potrebbe valere la pena utilizzare da subito questo approccio, nel caso fosse offerto dal laboratorio di riferimento.

Queste tecniche possono essere eseguite su diversi campioni biologici. Oltre ai tessuti lesionati, in caso d'infezione generalizzata gli altri tessuti che forniscono le maggiori probabilità di identificare mediante PCR il DNA degli

eventuali parassiti presenti sono, in ordine decrescente di sensibilità: midollo/linfonodo, cute, congiuntiva, *buffy coat*, sangue periferico. Va però ricordato che, nei cani resistenti, l'inoculazione di *Leishmania* può non essere seguita da disseminazione del parassita, quindi un'eventuale positività cutanea in assenza di lesioni cutanee in area endemica non significa necessariamente che il cane sia infetto e sviluppi infezione<sup>44</sup> e allo stesso modo, eventuali positività midollari possono poi essere seguite da negativizzazione.<sup>15</sup>

In linea di massima, è sempre meglio utilizzare materiale fresco o congelato o fissato in alcol etilico al 95%. L'utilizzo di campioni fissati in formalina e paraffinati fornisce rese diagnostiche peggiori, ma è in ogni modo utilizzabile. È quindi consigliabile richiedere l'esecuzione di questo esame al laboratorio in quei casi in cui le indagini citologiche e istologiche cutanee risultino negative pur in presenza di un forte sospetto diagnostico (vedi sopra).

### 1.4.4 Metodi sierologici

Nel giro di qualche mese dall'infezione, in media 5 mesi (intervallo: 1-22) per le infezioni naturali e 3 (intervallo: 1-6) per le infezioni sperimentali,<sup>48</sup> si assiste alla sieroconversione. Solo nei cani con disseminazione del parassita i titoli anticorpali tendono a risultare elevati o in aumento.

Le tecniche diagnostiche disponibili sono diverse. Alcune, come il *Western Blotting*, pur mostrando ottime prestazioni diagnostiche, non vengono utilizzate su larga scala per ragioni di tempi di esecuzione e di costi. Quelle più ampiamente disponibili sono rappresentate dai test di immunomigrazione rapida, dalle tecniche ELISA e dall'immunofluorescenza indiretta (IFAT), descritti schematicamente in seguito.

**Immunomigrazione rapida.** È di facile esecuzione e si può eseguire anche in strutture ambulatoriali, ma ha un'efficienza diagnostica inferiore rispetto alle tecniche ELISA e IFAT: la specificità è medio-alta ma la sensibilità è bassa (30-70%)<sup>44,49,50</sup> e può quindi fornire risultati falsi negativi. In questi casi, se permane un forte sospetto diagnostico, l'indagine sierologica va approfondita con uno degli altri due test. Nel caso di risultato positivo il limite risiede nel fatto che il test non consente di valutare il titolo anticorpale, che può invece essere utile nell'identificare i soggetti con disseminazione del parassita e nel monitorare la risposta terapeutica.

**Test ELISA.** Il siero in esame è posto in micropiastre rivestite di antigeni di *Leishmania*. In caso di positività, si apprezza una reazione colorimetrica quantificabile spettrofotometricamente e quindi non soggetta a variabili legate all'operatore. È un test specifico e ha sensibilità medio-alta (70-100%). La sensibilità è molto elevata quando vengono utilizzati test basati sull'associazione di più antigeni dei promastigoti, in modo da aumentare il numero di epitopi che possono fissare eventuali anticorpi presenti.<sup>44,49,51-53</sup> Inoltre permette di quantificare gli anticorpi specifici.

**IFAT.** Il test IFAT viene eseguito ponendo il siero in esame su vetrini su cui sono presenti promastigoti di *Leishmania*. Gli anticorpi eventualmente presenti si legano ai promastigoti e la positività viene evidenziata utilizzando anti-anticorpi fluorescenti. In questo caso è anche possibile determinare il titolo anticorpale utilizzando diluizioni seriali del siero in esame. La sensibilità e specificità dell'I-

FAT sono prossime al 100%<sup>44,50,51</sup> e per tale motivo il test viene considerato dall'Organizzazione Internazionale delle Epizootie (OIE) il metodo sierologico di riferimento.<sup>54</sup>

Per quanto riguarda ELISA ed IFAT, è opportuno accertarsi che il laboratorio di riferimento esegua sempre delle titolazioni "end point" cioè fino all'ultima diluizione positiva e non semplicemente fino ad un predeterminato valore soglia di positività. Sebbene non sempre il titolo anticorpale sia correlato alla gravità dei segni clinici (soprattutto per valori medio-bassi), in linea di massima la determinazione del titolo anticorpale permette di differenziare i cani infetti ma non malati, che avranno tendenzialmente un titolo basso, da quelli malati e con disseminazione del parassita, che avranno un titolo tendenzialmente elevato. La definizione di titolo "basso" o "elevato" va sempre rapportata alle soglie di positività riportate dal laboratorio di riferimento. La gran parte dei laboratori considera negativi i cani con titoli IFAT inferiori a 1:40, positivi quelli con titoli uguali-superiori ad 1:80 e dubbi i cani con titolo compreso tra 1:40 e 1:80. Alcuni laboratori usano titoli-soglia diversi, per tale motivo è sempre opportuno, soprattutto nel caso in cui si voglia verificare un eventuale aumento o diminuzione dei titoli anticorpali, fare riferimento sempre allo stesso laboratorio. In ogni caso, visto l'alto coefficiente di variazione tra e intra-test che caratterizza le prove sierologiche, come in molte altre malattie infettive è opportuno considerare come "elevati" solo i titoli che si discostino di almeno 4 volte rispetto al valore soglia di positività del laboratorio di riferimento (ad es., se il laboratorio considera "positivo" un titolo uguale-superiore a 1:80 si considera "elevato" un titolo superiore a 1:640).

#### 1.4.5 Metodi per la valutazione della risposta immunitaria cellulare

La valutazione della risposta cellulare è utilizzata a scopo di ricerca per valutare la risposta immunitaria in corso di malattia clinicamente evidente o nella resistenza alla malattia. Molte delle tecniche utilizzabili a scopo di ricerca, però, non sono ancora disponibili nella pratica clinica.

Le informazioni indirette sullo stato della risposta cellulomediata possono però essere tratte da test eseguibili in vivo come il test intradermico con leishmanina e la determinazione del rapporto di linfociti T CD4/CD8 nel sangue periferico mediante citofluorimetria.<sup>37</sup>

#### 1.5. Come integrare fra loro i vari dati raccolti, per formulare la diagnosi

Per raggiungere la diagnosi di leishmaniosi, il segnalamento, i dati anamnestici, i segni clinici eventualmente presenti ed i risultati delle prove di laboratorio vanno integrati tra loro.

In linea di massima, nei cani che presentano segni clinici ed alterazioni degli esami di laboratorio di base fortemente compatibili con LCan, la PCR e la sierologia e, solo in alcuni tessuti, la citologia, hanno tutte un'elevata sensibilità.<sup>44,55,56</sup> Nelle aree endemiche il problema può essere quello di stabilire una relazione causa-effetto tra presenza del parassita e alterazioni rilevate, col rischio di sovrastimare la LCan. In caso di cani con segni clinici compatibili, quindi, l'approccio che consente di ottimizzare l'efficacia diagnostica dei vari metodi, consentendo di ridurre al minimo gli interventi sul paziente e di accelerare i tempi diagnostici è quello di eseguire immediatamente un esame sierologico e l'analisi citologica di lesioni esplorabili, se presenti, e di proseguire con esami più specifici in funzione dei risultati ottenuti con queste prime prove. Le possibili combinazioni dei risultati e le relative interpretazioni sono riportate nel Box 3 dal quale si evince che il soggetto va considerato sicuramente malato di LCan quando l'esame citologico eseguito su tessuti presentanti lesioni compatibili (incluso il midollo osseo in caso di anemia) risulta positivo, indipendentemente dal risultato della sierologia, che però in questi casi dovrebbe risultare più probabilmente positiva (tranne nei rari casi di lesioni molto localizzate, o nelle fasi molto iniziali dell'infezione). Se la citologia risulta negativa, invece, la sierologia diventa fondamentale per considerare il soggetto malato o semplicemente "sospetto di malattia". Il titolo anticorpale, nel caso risulti elevato,

#### BOX 3

Schema delle diverse combinazioni dei risultati dei test ottenibili nei cani con segni clinici e alterazioni clinico-patologiche compatibili con leishmaniosi

Analisi	Risultato						
	Positivo	Negativo	Positivo <sup>†</sup>	Positivo <sup>§</sup>		Positivo <sup>§</sup>	
Sierologia	Positivo	Negativo	Positivo <sup>†</sup>	Positivo <sup>§</sup>		Positivo <sup>§</sup>	
Citologia	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo <sup>§</sup>		Positivo <sup>§</sup>	
Altri test	↓	↓	↓	↓		↓	
	↓	↓	↓	↓		↓	
	↓	↓	↓	↓		↓	
	↓	↓	↓	↓		↓	
	↓	↓	↓	↓		↓	
	↓	↓	↓	↓		↓	
Diagnosi	Malato <sup>‡</sup>	Malato <sup>‡</sup>	Malato <sup>‡</sup>	Infetto/malato <sup>‡</sup>	Esposto <sup>a,b</sup>	Infetto/Malato <sup>a,b</sup>	Esposto <sup>a</sup>

<sup>‡</sup>malato di leishmaniosi; <sup>†</sup>titolo alto = 4 volte la soglia di positività del laboratorio di riferimento; <sup>§</sup> titolo basso-intermedio; <sup>a</sup> monitorare con sierologia; <sup>b</sup> escludere altre possibili cause dei segni clinici presenti.

indica che il soggetto è malato, mentre se il titolo anticorpale risulta basso, non è possibile escludere che il soggetto sia infetto da *Leishmania*, ma affetto da una malattia diversa. In questo caso, ulteriori informazioni possono essere raccolte approfondendo le indagini diagnostiche in maniera diversa in funzione delle lesioni presenti:

- nel caso in cui le lesioni citologicamente negative siano cutanee ed il quadro citologico sia fortemente compatibile con leishmaniosi, si deve ricorrere alla biopsia cutanea ed all'esame istologico per rilevare la presenza di *Leishmania*. L'impiego dell'immunoistochimica è suggerito quando siano presenti quadri istologici compatibili con LCan ma non si osservino parassiti con le colorazioni di routine: se anche questo approccio risulta negativo, va effettuata una PCR sulla biopsia cutanea. Se anche quest'ultima indagine risulta negativa, il cane va considerato non malato, ed il titolo anticorpale deve essere interpretato come segno di esposizione pregressa alla malattia, o come sospetto infetto, ma affetto da una malattia diversa dalla LCan. In questo caso si devono monitorare nel tempo i titoli anticorpali, che in caso di riattivazione dell'infezione tenderanno ad elevarsi.
- nel caso le lesioni non siano cutanee e il quadro sia fortemente compatibile con leishmaniosi si deve eseguire una PCR nelle sedi in cui è più probabile rilevare il parassita, rappresentate prevalentemente da midollo osseo e/o linfonodi. Se queste indagini risultano negative il cane va considerato esposto all'infezione e monitorato nel tempo. Se invece risultano positive, il cane deve essere considerato infetto o, malato, se sia possibile correlare con certezza la lesione all'infezione. In ogni caso, l'eventuale progressione verso la malattia va monitorata con successivi esami sierologici.

## 2. CLASSIFICAZIONE

[a cura di Oliva G (coordinatore), Crotti A, Maroli M, Roura X, Zatelli A]

L'infezione da *L. infantum* può evolvere, in tempi che vanno da poche settimane a molti mesi, in quadri di malattia estremamente variabili e polimorfi, non sempre facilmente classificabili. Ciononostante il clinico, al momento della diagnosi, dovrebbe sempre cercare di inquadrare l'infezione-malattia nel suo stadio evolutivo, sia per consentirne l'opportuna terapia, sia per anticipare possibili evoluzioni verso fasi più gravi o di irreversibilità. Per i motivi sopra esposti, pertanto, la classificazione di seguito proposta non vuole tentare di "ingabbiare" una malattia così complessa in uno schema, ma solamente offrire uno strumento utile nella gestione dei pazienti affetti da tale malattia.

### 2.1. Definizione di cane esposto

Vengono definiti "esposti" i cani clinicamente sani nei quali i test diagnostici cito-istologici, parassitologici e molecolari risultino negativi ma siano evidenziabili titoli anticorpali specifici, non superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento. I cani esposti all'infezione da *L. infantum* sono solitamente soggetti che soggiornano o

hanno soggiornato, durante una o più stagioni di trasmissione, in un'area dove è accertata la presenza di flebotomi vettori del parassita.

### 2.2. Definizione di un cane infetto

Un cane infetto da *L. infantum* è un soggetto nel quale è dimostrabile la presenza del parassita, con metodi diretti (microscopia, coltura o PCR) e con metodi indiretti (mesa in evidenza di anticorpi specifici). Nelle zone endemiche, la sola positività alla PCR, eseguita da materiale cutaneo in assenza di lesione, durante la stagione di trasmissione (giugno-ottobre), potrebbe essere non sufficiente a definire infetto un cane.

### 2.3. Definizione di cane malato

Un cane infetto può essere definito "malato" quando mostra uno o più segni clinici suggestivi di leishmaniosi (box n. 1). Dato l'estremo polimorfismo clinico della leishmaniosi canina, un cane infetto può essere definito malato anche se mostra uno o più segni clinici diversi da quelli riportati nel box n. 1, purché chiaramente correlabili all'infezione in atto.

Un cane infetto da *L. infantum* può essere definito malato anche se, in assenza di segni clinici rilevabili, mostra alterazioni ematologiche, ematobiochimiche ed urinarie riferibili alla leishmaniosi (box n. 2), oppure se mostra una o più alterazioni di laboratorio diverse da quelle sopra elencate, purché siano sicuramente correlabili con l'infezione in atto.

#### 2.3.1 Definizione di cane malato con quadro clinico grave

Un cane infetto da *L. infantum* può essere definito malato con quadro clinico grave se:

- a) è stato già sottoposto a uno o più trattamenti terapeutici con farmaci anti-*Leishmania* e non mostra una remissione della sintomatologia;
- b) è affetto da nefropatia proteinurica;
- c) è affetto da insufficienza renale cronica;
- d) è affetto da gravi malattie oculari che possano comportare la perdita funzionale e/o richiedano terapie immunodepressanti;
- e) è affetto da gravi malattie articolari che possano invalidare la funzione motoria e/o richiedano terapie immunodepressanti;
- f) è affetto da altre severe malattie concomitanti, di natura infettiva, parassitaria, neoplastica, endocrina o dismetabolica.

## 3. GESTIONE DEL PAZIENTE LEISHMANIOTICO PROTEINURICO

[a cura di Zini E (coordinatore), Castagnaro M, Lubas G, Zatelli A]

### 3.1. Patogenesi del danno renale

Nel bacino del Mediterraneo la LCan è una causa comune di glomerulonefrite. Il danno renale causato dalla

leishmaniosi è primariamente attribuibile alla deposizione intraglomerulare di immunocomplessi circolanti, formati tra gli antigeni del microrganismo e gli anticorpi prodotti in risposta allo stesso. La deposizione degli immunocomplessi è principalmente glomerulare.<sup>57,58</sup> Gli immunocomplessi depositati favoriscono l'attivazione della via classica del complemento, le cui principali funzioni utili sono rappresentate dalla solubilizzazione degli immunocomplessi e la fagocitosi di questi da parte di macrofagi e granulociti neutrofili. Le componenti C3a e C5a del complemento esplicano un'azione di richiamo nei confronti delle cellule dell'immunità naturale, favorendo lo sviluppo di una condizione infiammatoria locale che può essere invece dannosa per l'intero nefrone.<sup>59</sup> Inoltre, alcune interleuchine prodotte dai macrofagi esercitano un'azione chemotattica nei confronti dei linfociti, con successivo potenziamento della risposta immune. L'attivazione del sistema immunitario causa infiammazione primariamente a livello glomerulare. Per continuità, anche il comparto tubulointerstiziale è interessato. Le lesioni renali sono causa di proteinuria e favoriscono lo sviluppo dell'insufficienza renale.<sup>60</sup>

### 3.2. Patogenesi della proteinuria

In condizioni fisiologiche il glomerulo consente la libera filtrazione delle proteine aventi un peso molecolare (PM) inferiore a 69 kD (ad es., lisozima,  $\beta$ 2-microglobulina) e di una piccola quota di albumine (PM = 69 kD). Le proteine di peso maggiore sono invece trattenute nel torrente circolatorio (ad es., transferrina, immunoglobuline). Inoltre, la membrana basale glomerulare presenta sulla sua superficie diverse cariche negative, le quali si oppongono alla filtrazione delle proteine aventi carica netta negativa (ad es., albumine). Il tubulo contorto prossimale è deputato al riassorbimento delle proteine filtrate dal glomerulo. In condizioni normali la quota di proteine filtrate con PM inferiore o uguale a 69 kD è pressoché interamente riassorbita e nell'urina definitiva se ne riscontrano minime quantità.<sup>(61)</sup> In corso di danno glomerulare, la quantità complessiva delle proteine nel filtrato aumenta, in particolar modo a favore delle proteine aventi PM uguale e superiore ai 69 kD.<sup>62</sup> Se viene mantenuta l'integrità tubulare, le cellule del tubulo prossimale aumentano la loro attività per riassorbire l'intera quota proteica in eccesso. Tuttavia, se i recettori tubulari per le proteine sono saturati, nell'urina definitiva aumenta la quantità di proteine riscontrabili (proteinuria). I recettori tubulari per le proteine urinarie sono normalmente dotati di una scarsa specificità, quindi in corso di proteinuria glomerulare si assiste ad una competizione per il riassorbimento a livello tubulare. Le proteine ad alto PM competono tra loro ma anche con le proteine a basso PM e viceversa.<sup>61</sup> Nell'urina definitiva si possono, pertanto, trovare sia proteine ad alto che a basso PM, sebbene in corso di danno glomerulare isolato le proteine ad alto peso siano rilevabili in quantità maggiore.<sup>62</sup> In corso di leishmaniosi, tuttavia, l'infiltrato flogistico indotto dagli immunocomplessi depositati a livello glomerulare interessa sia il comparto glomerulare che quello tubulare.<sup>57,58</sup> Trattandosi quindi di un danno renale di tipo misto, il tipo di proteinuria rilevabile è sia di origine glomerulare che tubulare (proteinuria mista).<sup>60,62,63</sup>

### 3.3. Valutazione clinica della proteinuria

L'uso dell'esame quantitativo della proteinuria mediante rapporto tra proteine e creatinina urinarie (PU/CU) e di quello qualitativo mediante tecnica sodiumdodecilsulphate-agarose gel electrophoresis (SDS-AGE), o SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), consente di identificare in modo non invasivo la presenza di un danno renale in corso di differenti glomerulonefriti, comprese quelle indotte dalla leishmaniosi.<sup>60,62,63</sup> Nel cane, l'esame quantitativo mediante PU/CU pone alcuni problemi interpretativi, poiché non tutti gli autori riconoscono un valore soglia univoco per definire la presenza/assenza di proteinuria e non esiste un protocollo standardizzato per la misurazione delle proteine nelle urine. È opinione generale che valori di PU/CU inferiori a 0,5 indicano una proteinuria non significativa, i valori compresi tra 0,5 e 0,7 siano dubbi e necessitino di ulteriori approfondimenti ed i valori superiori a 0,7 siano indicativi di proteinuria.<sup>64</sup> Inoltre, nei cani con proteinuria renale il PU/CU non distingue il tipo di danno in corso. Tuttavia, nei cani affetti da leishmaniosi l'esame quantitativo della proteinuria riveste un ruolo di primaria importanza, in particolare nel follow-up in corso di trattamento. Infatti, la valutazione periodica del PU/CU offre al clinico un parametro utile per valutare l'efficacia della terapia.<sup>65</sup>

Diversamente dall'indagine quantitativa, l'esame qualitativo delle urine nei cani affetti da nefropatie di diversa eziologia sembra possa caratterizzare le lesioni renali.<sup>62</sup> Sebbene l'esame qualitativo non fornisca informazioni circa il tipo di danno glomerulare, esso è in grado di definire l'entità del danno tubulo-interstiziale. In particolare, la presenza di bande proteiche aventi PM compreso tra i 10 e 20 kD risulta essere particolarmente sensibile e specifica per l'identificazione dei cani con danno tubulo-interstiziale grave. In generale, tuttavia, a parte il promettente contributo per la caratterizzazione dei cani con danno tubulo-interstiziale più grave, il numero di studi riportati in letteratura veterinaria sul metodo qualitativo non è ancora sufficiente per consentire di definirne in modo inequivocabile il valore diagnostico e prognostico.

### 3.4. Approccio terapeutico alla proteinuria

#### 3.4.1 Aspetti generali

In alcuni modelli sperimentali di proteinuria è dimostrato che l'eccessivo riassorbimento delle proteine da parte delle cellule del tubulo contorto prossimale è in grado di perpetuare il danno renale, portando ad una progressiva riduzione del numero dei nefroni.<sup>61</sup> Infatti, le cellule del tubulo contorto prossimale sottoposte ad un eccessivo riassorbimento di proteine possono funzionare da cellule presentanti gli antigeni, con successivo richiamo di linfociti ed attivazione dell'infiammazione. Non solo i tubuli ma anche i glomeruli possono essere danneggiati da un'eccessiva filtrazione di proteine. In particolare, le cellule mesangiali dei soggetti proteinurici vanno incontro a proliferazione e sintetizzano quantità maggiori di matrice. Nell'uomo e negli animali da esperimento, il grado di proteinuria è riconosciuto quale fattore di rischio indipendente per lo sviluppo dell'insufficienza renale e per la sua progressione.<sup>66</sup> Nei ca-



ni con insufficienza renale cronica è stata recentemente dimostrata un'associazione tra il grado di proteinuria al momento della diagnosi e la possibilità di sviluppare un peggioramento della funzione renale, una crisi uremica e la possibilità di venire a morte.<sup>67</sup>

Qui di seguito riportiamo la lista aggiornata degli accorgimenti terapeutici utili per il trattamento delle nefropatie proteino-disperdenti nel cane, con particolare riferimento alla leishmaniosi.

### 3.4.2 Allopurinolo ed antimonio pentavalente

Poiché gli immunocomplessi giocano un ruolo fondamentale nella patogenesi del danno renale e dello sviluppo della proteinuria in corso di leishmaniosi<sup>57,58,60</sup> il corretto impiego della terapia nei confronti del protozoo (ad es., allopurinolo, antimonio pentavalente sotto forma di antimoniato di N-metilglucamina) potrebbe nel tempo diminuire il numero di immunocomplessi circolanti. La riduzione degli immunocomplessi depositati nel glomerulo risulterebbe vantaggiosa per l'integrità anatomica e funzionale dell'intero nefrone. A tal proposito, recentemente sono stati dimostrati gli effetti benefici dell'allopurinolo utilizzato quale terapia singola nei cani affetti da leishmaniosi.<sup>65</sup> In particolare è stato osservato che, dopo sei mesi, l'allopurinolo (10 mg/kg/q12h, PO) rispetto al placebo: i) previene la comparsa di proteinuria nei cani infetti, che non presentano proteinuria ed aumento della creatinemia; ii) riduce il grado di proteinuria nei cani infetti e proteinurici ma senza aumento della creatinemia. Nei cani infetti, proteinurici e con aumento della creatinemia il grado di proteinuria dopo sei mesi non peggiora significativamente. In questo gruppo, tuttavia, nessuno dei cani ha ricevuto il placebo, pertanto non è possibile stabilire se l'allopurinolo abbia avuto nel complesso un effetto vantaggioso. Inoltre, l'allopurinolo rispetto al placebo previene il deterioramento del volume di filtrazione glomerulare (GFR) nei cani infetti, proteinurici ma senza aumento della creatinemia. In quest'ultimo gruppo l'effetto benefico sul GFR si associa ad un miglioramento delle lesioni tubulointerstiziali.

Studi simili circa l'impiego dell'antimonio pentavalente da solo o dell'associazione di questo con allopurinolo nei cani affetti da leishmaniosi non sono stati ancora portati a termine.

#### Somministrazione

Nei cani affetti da leishmaniosi sono stati pubblicati diversi protocolli terapeutici con allopurinolo ed antimonio pentavalente.<sup>68</sup> Alcuni di questi prevedono l'uso di un solo farmaco, altri una combinazione. Non è stato ancora verificato quale protocollo sia superiore per il trattamento della proteinuria o del danno renale. In questo paragrafo il G.S.L.C. si limita a riportare le attuali conoscenze circa gli effetti collaterali dei due farmaci sulla funzione urologica.

Nei cani affetti da leishmaniosi, sei mesi di terapia con allopurinolo (10 mg/kg/q12h, PO) possono causare cristalluria di xantina (Plevraki et al., 2006).<sup>65</sup> La cristalluria non si associa a sintomatologia clinica, né alla formazione di calcoli. Nell'uomo l'emivita del farmaco aumenta se il GFR è diminuito. Riduzioni della dose di allopurinolo sono talora effettuate nei cani con un aumento della creatinemia, sebbene non sia noto se l'emivita aumenti anche in questa specie e se ciò si associ ad effetti collaterali.

Secondo l'esperienza del G.S.L.C., l'allopurinolo non sembra avere effetti indesiderati rilevabili a carico dei reni. Alla dose sopra riportata, nei cani senza aumento della creatinemia l'allopurinolo riduce la proteinuria e la progressione della nefropatia. Nei cani con aumento della creatinemia l'efficacia non è ancora dimostrata.<sup>65</sup>

L'antimonio pentavalente nell'uomo può causare tossicità tubulare ed i pazienti con riduzione del GFR sono più suscettibili. Nei cani l'escrezione dell'antimonio pentavalente è per oltre l'80% renale. Nei cani affetti da leishmaniosi non sono stati descritti chiari effetti collaterali sulla funzione renale a seguito dell'impiego del farmaco. Tuttavia, le dosi finora riportate in letteratura sono state piuttosto variabili (20,4-50 mg/kg, q12-24h, per 1-6 settimane, generalmente per via IM o SC) e la maggior parte degli studi ha coinvolto animali con creatinemia normale. In un recente studio l'antimonio pentavalente (75 mg/kg, q12h, per 21 giorni, IM) è stato somministrato quale unica terapia a tre cani con aumento della creatinemia, uno dei quali presentava i segni clinici dell'azotemia.<sup>69</sup> La terapia ha determinato un miglioramento della funzione renale nei due cani asintomatici. Il cane sintomatico è deceduto dopo tre giorni dall'inizio del trattamento a causa del peggioramento della sintomatologia. È stato ipotizzato che l'antimonio pentavalente avesse compromesso ulteriormente la funzione renale.

Sulla base di queste informazioni, il G.S.L.C. sottolinea l'opportunità di verificare ripetutamente i valori sierici della creatinina e dell'urea durante il trattamento, soprattutto nei cani con aumento della creatinemia. Un aumento dei valori ematici di uno od entrambi i parametri indica la necessità di ridurre la dose o di interrompere la somministrazione di antimonio pentavalente.

### 3.4.3 ACE inibitori

L'impiego dell'enalapril (0,5 mg/kg/q24h, PO), un ACE inibitore, si è dimostrato d'aiuto nei cani con glomerulonefrite idiopatica.<sup>70</sup> L'enalapril ha ridotto la quantità di proteine perse con le urine, verosimilmente grazie alla diminuzione della pressione endocapillare glomerulare ed alla riduzione dell'ipertrofia mesangiale.

Circa l'impiego degli ACE inibitori nei cani con insufficienza renale cronica, in un modello sperimentale (necrotomia parziale) l'enalapril (0,5 mg/kg/q12h, PO) si è dimostrato efficace per ridurre la pressione endocapillare glomerulare ed ipertrofia mesangiale e per rallentare lo sviluppo di lesioni tubulointerstiziali.<sup>71</sup>

#### Somministrazione

Il G.S.L.C. suggerisce l'impiego di routine dell'enalapril secondo la dose indicata da Grauer et al.<sup>70</sup> (0,5 mg/kg/q24h, PO) nei cani affetti da leishmaniosi con proteinuria (rapporto PU/CU > 0,7) e/o aumento della creatinemia. Dal momento che gli ACE inibitori possono ridurre la pressione sistemica ed eventualmente la perfusione renale, è indispensabile verificare ripetutamente i valori sierici di creatinina ed urea. In particolare, nell'esperienza del G.S.L.C. il peggioramento della funzione renale può svilupparsi soprattutto durante le prime due settimane di trattamento. In questo caso la dose del farmaco deve essere diminuita o può essere necessario interrompere la somministrazione.

Secondo il G.S.L.C., i potenziali effetti benefici sul grado di proteinuria solitamente compaiono dopo 1-2 mesi di somministrazione.

### 3.4.4 Acido acetilsalicilico

L'acido acetilsalicilico è utilizzato per ridurre l'attivazione delle piastrine, le quali possono esacerbare la condizione di ipercoagulabilità presente nelle nefropatie proteinodisperdenti. Nel cane, il farmaco somministrato a basse dosi (0,5 mg/kg/q24h, PO) inibisce la ciclo-ossigenasi piastrinica risparmiando quella endoteliale.<sup>72</sup> L'acido acetilsalicilico trova impiego quale corollario alla terapia dei cani proteinurici per il controllo dell'ipercoagulabilità, sebbene il suo beneficio non sia comprovato.<sup>70</sup>

#### *Somministrazione*

Si consiglia l'impiego dell'acido acetilsalicilico nei cani affetti da leishmaniosi ed aventi proteinuria, indipendentemente dalla presenza o assenza di un aumento della creatinemia. Alla dose sopra indicata il G.S.L.C. non ha osservato alterazioni del profilo coagulativo o peggioramenti della funzione renale.

### 3.4.5 Dieta

Il grado di proteinuria può essere ridotto grazie all'ausilio di una dieta a ridotto contenuto di proteine.<sup>73</sup> Tuttavia, è opportuno notare che l'impiego delle diete ipoproteiche può rendere difficile il mantenimento di un peso corporeo e massa muscolare (Body Condition Score) adeguati ed una concentrazione plasmatica normale delle albumine. Per questo motivo, e per il fatto che i cani affetti da leishmaniosi spesso presentano scarse masse muscolari, riteniamo che l'impiego di una dieta a basso contenuto proteico debba essere valutata per ogni caso, singolarmente. Tuttavia, se il cane affetto da leishmaniosi ha un aumento della creatinemia e manifesta i sintomi clinici dell'azotemia, una dieta ipoproteica può ridurre la sintomatologia. Inoltre, nei cani con aumento della creatinemia una diminuzione del fosforo assunto con la dieta può rallentare il declino della funzione renale ed aumentare i tempi di sopravvivenza.<sup>74</sup>

#### *Somministrazione*

Nei cani affetti da leishmaniosi con proteinuria, in assenza di un aumento della creatinemia, non è stato ancora definito con chiarezza il ruolo di una dieta a contenuto proteico controllato. L'impiego di una dieta commerciale a basso contenuto di proteine e fosforo è, invece, indicata nei cani con aumento della creatinemia, indipendentemente dalla presenza o assenza di proteinuria. Se il peso corporeo del cane diminuisce è possibile che l'animale non si alimenti adeguatamente o che la dieta non copra i fabbisogni giornalieri. Nel primo caso si raccomanda di identificare i fattori che possono indurre anoressia (ad es., nausea, ulcere gastroenteriche, sovradosaggio di farmaci) e trattarli adeguatamente (ad es., antiemetici, H<sub>2</sub>-antagonisti). Nel secondo caso può essere indicato aumentare la quantità di cibo somministrata oppure utilizzare una dieta differente.

### 3.4.6 Acidi grassi essenziali ω-3

Nei cani parzialmente nefrectomizzati, il supplemento dietetico di acidi grassi essenziali ω-3 ha dimostrato un ef-

fetto renale protettivo.<sup>75</sup> Rispetto al supplemento con acidi grassi saturi o con acidi grassi ω-6, gli acidi grassi essenziali ω-3 hanno prevenuto il deterioramento del GFR e della struttura renale, grazie ad un effetto benefico sull'emodinamica glomerulare. Il supplemento ha anche mantenuto il grado di proteinuria su valori lievemente inferiori. Quest'ultimo effetto non è stato tuttavia significativo. Gli acidi grassi essenziali ω-3 potrebbero essere utili come ausilio terapeutico nei cani affetti da leishmaniosi ed aventi un aumento della creatinemia.

#### *Somministrazione*

Dal momento che non esistono studi circa l'impiego degli acidi grassi essenziali ω-3 in cani affetti da leishmaniosi, il loro impiego necessita d'essere ulteriormente approfondito.

### 3.4.7 Terapia contro l'ipertensione

In corso di leishmaniosi il 61,5% dei cani con proteinuria ed aumento della creatinemia presenta ipertensione arteriosa sistemica. L'ipertensione sistemica si riscontra anche nel 10% circa dei cani con proteinuria in assenza di un aumento della creatinemia.<sup>76</sup> Nel cane l'ipertensione sistemica è dimostrata essere un fattore di rischio per la progressione del danno renale.<sup>77</sup>

Pertanto, è necessario misurare la pressione sistemica nei cani affetti da leishmaniosi e sempre trattare l'ipertensione, se presente. Attualmente, una buona azione antipertensiva si ottiene mediante l'impiego del calcio-bloccante amlodipina besilato (0,1-0,5 mg/kg/q12-24h, PO).<sup>78</sup> Dal momento che il farmaco potrebbe determinare un aumento della pressione nei capillari del glomerulo, al fine di migliorare l'emodinamica glomerulare è indicato associare un farmaco ACE inibitore.<sup>79</sup>

#### *Somministrazione*

Il trattamento contro l'ipertensione sistemica si somministra quando la pressione arteriosa sistolica è superiore a 180 mm Hg (metodo Doppler), oppure è compresa tra 150 e 179 mm Hg in presenza di segni clinici od alterazioni di laboratorio compatibili con l'ipertensione sistemica (ad es., emorragie retiniche, cardiopatia ipertensiva, segni neurologici corticali, proteinuria, azotemia).<sup>76</sup> La terapia antipertensiva è indicata sia nei cani con funzione renale preservata che nei cani con un aumento della creatinemia. Un impiego scorretto della terapia antipertensiva può ridurre eccessivamente la pressione di filtrazione glomerulare ed il GFR. Pertanto durante la terapia, oltre la pressione sistemica, si suggerisce di monitorare anche la creatinemia. Un suo aumento potrebbe indicare un peggioramento dell'emodinamica renale indotto dal trattamento.

La riduzione della pressione sistemica si ottiene solitamente entro poche ore dall'inizio del trattamento.<sup>79</sup> Il monitoraggio della pressione dovrebbe essere compiuto più volte durante i primi 2-3 giorni e, successivamente, con regolarità (ad es. ogni 1-2 settimane). Nell'esperienza del G.S.L.C., in alcuni cani la combinazione di amlodipina ed ACE inibitore non è sufficiente a ridurre la pressione sistemica. In questi casi può essere indicato modificare la dose di amlodipina (se è stato utilizzato un dosaggio basso) o aggiungere un altro farmaco (ad es., bloccanti beta-adrenergici, antagonisti dell'aldosterone). Quale prima scelta,

il GSLC solitamente aggiunge un farmaco bloccante beta-adrenergico selettivo (atenololo: 0,5-1,0 mg/kg/q12-24h, PO). L'obiettivo della terapia antipertensiva è di ridurre la pressione arteriosa sistolica a valori inferiori a 150-160 mm Hg (metodo Doppler). Se questo obiettivo non fosse raggiungibile, la pressione dovrebbe essere comunque ridotta di almeno 50-60 mm Hg rispetto ai valori iniziali.

## Parole chiave

*Leishmaniosi, cane, linee-guida, diagnosi, classificazione, proteinuria.*

## Key words

*Leishmaniasis, dog, guidelines, diagnosis, classification, proteinuria.*

## Bibliografia

- Cabral M, O'Grady J, Alexander J: Demonstration of Leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.* 14(5):531-539, 1992.
- Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, et al.: The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 76(3):173-180, 1998.
- Solano-Gallego L, Lluall J, Ramos G, Riera C, et al.: The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. *Vet Parasitol* 90(1-2):37-45, 2000.
- Bettini S, Gramiccia M, Gradoni L, Atzeni MC: Leishmaniasis in Sardinia. II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in the province of Cagliari. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 80, 458-459, 1986.
- Maroli M, Gramiccia M, Gradoni L: Natural infection of sandfly *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81:596-598, 1987.
- Maroli M, Gramiccia M, Gradoni L, Ready P, et al.: Natural infections of phlebotomine sandflies with Trypanosomatidae in central and south Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82:227-228, 1988.
- Maroli M, Gramiccia M, Gradoni L, Troiani M, et al.: Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* with an enzymatic variant of *Leishmania infantum* in the Campania region of Italy. *Acta Trop* 57, 333-335, 1994.
- Léger N, Gramiccia M, Gradoni L, Madulo-Leblond G, et al.: Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the island of Corfu, Greece. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82:419-420, 1988.
- Léger N, Depaquit J, Ferte H., Rioux J.A., et al.: Phlebotomine sandflies (Diptera-Psychodidae) of the isle of Cyprus. II-Isolation and typing of *Leishmania* (*Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (zymodeme MON 1) from *Phlebotomus* (Larroussius) *tobbi* Adler and Theodor, 1930. *Parasite*, 7(2):143-146, 2000.
- Garifallou A, Hadjiantoniou M, Schnur LF, Yuval B, et al.: Epidemiology of human and canine leishmaniasis of the island of Zakynthos. In: *Leishmaniasis*. Ed: DT Hart Plenum Publishing Corporation, 1989, pp 1011-1015.
- Izri MA, Belazzoug S: *Phlebotomus* (Larroussius) *perfiliewi* naturally infected with dermatropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 87(4):399, 1993.
- Pozio E, Gradoni L, Gramiccia M: La leishmaniosi canine en Italia de 1910 a 1983. *Ann Parasitol Hum Comp.* 60:543-553, 1985.
- Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, Genchi C, et al.: Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parassitologia* 46:193-197, 2004.
- Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, et al. Leishmap: the network for monitoring the spread of canine leishmaniasis and its vectors in northern Italy. *Proc. Third World Congress on Leishmaniasis, Palermo-Terrasini* 2005, p. 201.
- Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, et al.: Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol* 44:1318-1322, 2006.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, et al.: Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62:229-235, 1994.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, et al.: Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitol* 122(Pt 3):253-261, 2001.
- Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, et al.: Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 88:21-30, 2002.
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, et al.: Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57:1-88, 2004.
- Brachelente C, Muller N, Doherr MG, Sattler U, et al.: Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet Pathol* 42:166-175, 2005.
- Chamizo C, Moreno J, Alvar J: Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 103:67-75, 2005.
- Guarga JL, Lucientes J, Peribanez MA, Molina R, et al.: Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop* 77(2):203-207, 2000.
- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, et al.: Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Sci* 69(3):249-253, 2000.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, et al.: Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 183(9):1421-1424, 2001.
- Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva F, Santos-Gomes GM et al.: Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 77:557-561, 1991.
- Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, Francino O: Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered* 96(7):755-758, 2005.
- Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, Consenti B, et al.: Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur J Epidemiol* 8(2):273-276, 1992.
- Fisa R, Gallego M, Castillejo S, Aisa MJ, et al.: Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83(2):87-97, 1999.
- Shiddo SA, Aden Mohamed A, Akuffo HO, Mohamud KA, et al.: Visceral leishmaniasis in Somalia: prevalence of markers of infection and disease manifestations in a village in an endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89(4):361-365, 1995.
- Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, et al.: Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun* 70(5):2288-96, 2002.
- Slappendel RJ: Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q* 10:1-16, 1988.
- Ciamarella P, Oliva G, Luna RD, et al.: A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 141(21):539-543, 1997.
- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, et al. Clinical consideration on canine leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *JAHA* 35:376-383, 1999.
- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, et al.: *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol.* 96(4):265-276, 2001.
- Martinez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Cerón JJ: Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec* 150(8):241-244, 2002.
- Bonfanti U, Zini E, Minetti E, Zatelli A: Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia canis*. *J Vet Int Med* 18(5):618-624, 2004.
- Rosypal AC, Gogal RM Jr, Zajac AM, Troy GC, et al.: Flow cytometric analysis of cellular immune responses in dogs experimentally infected with a North American isolate of *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 131:45-51, 2005.
- Mylonakis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, et al.: Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol* 34(3):243-247, 2005.
- Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, et al. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg* 73(1):82-86, 2005.

40. Roura X, Fondevila D, Sanchez A, Ferrer L: Detection of Leishmania infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 11(4):385-387, 1999a.
41. Muller N, Zimmermann V, Forster U, Bienz M, et al.: PCR-based detection of canine Leishmania infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol* 114(3):223-229, 2003.
42. Cortes S, Rolao N, Ramada J, Campino L: PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98(1):12-17, 2004.
43. Roura X, Sanchez A, Ferrer L: Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec* 144(10):262-264, 1999b.
44. Gradoni, 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Canine leishmaniasis: moving towards a solution*. Ed. R Killick-Kendrick Intervet International, Boxmeer, NL.
45. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, et al.: Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40(1):210-215, 2002.
46. Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, et al.: Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Paras* 99(2):105-111, 2001.
47. Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, et al.: Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 137:214-221, 2006.
48. Moreno J, Alvar J: Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18(9):399-405, 2002.
49. Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR: Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 40:2352-2356, 2002.
50. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, et al.: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 43:5515-5519, 2005.
51. Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A: Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 59:13-21, 1995.
52. Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C: Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 36:58-63, 1998.
53. Riera C, Valladares JE, Gallego M, Aisa MJ: Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 84(1-2):33-47, 1999.
54. Gradoni L, Gramiccia M: *Leishmaniasis*, In OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccine, 4th ed. Office International des Epizooties, Paris, France, 2000 p. 803-812.
55. Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, et al.: Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Tropical Med Hyg* 53(3):251-255, 1995.
56. Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, et al: A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol* 109(1-2):19-27, 2002.
57. Mancianti F, Poli A, Bionda A: Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia* 31:213-230, 1989.
58. Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, et al. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron* 57:444-452, 1991.
59. Kerjaschki D, Neale TJ: Molecular mechanisms of glomerular injury in rat experimental membranous nephropathy (Heymann nephritis). *J Am Soc Nephrol* 7:2518-2526, 1996.
60. Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, et al.: Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res* 64:558-561, 2003.
61. Bazzi C, Petrini C, Rizza V, Arrigo G, et al.: Characterization of proteinuria in primary glomerulonephritides. SDS-PAGE patterns: clinical significance and prognostic value of low molecular weight ("tubular") proteins. *Am J Kidney Dis* 29:27-35, 1997.
62. Zini E, Bonfanti U, Zatelli A: Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. *Am J Vet Res* 65:964-971, 2004.
63. Abate O, Vittone V, Zanatta R, Tarducci A, et al.: Valutazione qualitativa della proteinuria mediante SDS-AGE ai fini della localizzazione del danno renale nel cane e nel gatto. *Veterinaria*, 19:9-14, 2005.
64. Biewenga WJ: Proteinuria in the dog: a clinicopathological study in 51 proteinuric dogs. *Res Vet Sci* 41:257-264, 1986.
65. Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, et al.: Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 20:228-233, 2006.
66. Coppo R, D'Amico G.: Factors predicting progression of IgA nephropathies. *J Nephrol* 18:503-512, 2005.
67. Jacob F, Polzin DJ, Osborne CA, Neaton JD, et al.: Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *J Am Vet Med Assoc* 226:393-400, 2005.
68. Oliva G, Foglia Manzillo V, Pagano A.: Canine leishmaniasis: evolution of the chemotherapeutic protocols. *Parassitologia* 46:231-234, 2004.
69. Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Ciarlini PC, Marques FJ, et al. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Res Vet Sci*. 2007 Aug; 83 (1):105-8.
70. Grauer GF, Greco D, Gretzy D, Cowgill LD et al.: Effects of enalapril treatment versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. *J Vet Intern Med* 14:526-533, 2000.
71. Brown SA, Finco DR, Brown CA, Crowell WA, et al.: Evaluation of the effects of inhibition of angiotensin converting enzyme with enalapril in dogs with induced chronic renal insufficiency. *Am J Vet Res* 64:321-327, 2003.
72. Rackear D, Feldman B, Farver T, Lelong L: The effect of three different dosages of acetylsalicylic acid on canine platelet aggregation. *J Am Anim Hosp Assoc* 24: 23-26, 1988.
73. Burkholder WJ, Lees GE, LeBlanc AK, Slater MR, et al.: Diet modulates proteinuria in heterozygous female dogs with x-linked hereditary nephritis. *J Vet Intern Med* 18:165-175, 2004.
74. Jacob F, Polzin DJ, Osborne CA, Allen TA, et al.: Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic renal failure in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 220:1163-1170, 2002.
75. Brown SA, Brown CA, Crowell WA, Barsanti JA, et al.: Beneficial effects of chronic administration of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs with renal insufficiency. *J Lab Clin Med* 131:447-455, 1998.
76. Cortadellas O, del Palacio MJ, Bayon A, Albert A, et al.: Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *J Vet Intern Med* 20:941-947, 2006.
77. Jacob F, Polzin DJ, Osborne CA, Neaton JD, et al.: Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or of dying in dogs with chronic renal failure. *J Am Vet Med Assoc* 222:322-329, 2003.
78. Dodd MG, Gardiner DG, Carter AJ, Sutton MR, et al.: The hemodynamic properties of amlodipine in anesthetized and conscious dogs: comparison with nitrendipine and influence of beta-adrenergic blockade. *Cardiovasc Drugs Ther* 3:545-555, 1989.
79. Hayashi K, Ozawa Y, Fujiwara K, Wakino S, et al.: Role of actions of calcium antagonists on efferent arterioles with special references to glomerular hypertension. *Am J Nephrol* 23:229-244, 2003.