

Caso clínico: Enfermedad renal crónica asociada a Leishmaniosis.

Case Report: Chronic kidney disease related with canine leishmaniasis.

Pablo García¹. Joaquín Illanes².

Recibido: 23 Noviembre 2017.

Aceptado: 12 Diciembre 2017.

Resumen

Se describe el caso de un paciente canino, macho entero, de ocho años, raza beagle que presentaba decaimiento, hiporexia, blefaritis, dermatitis exfoliativa leve, linfoadenopatía superficial y polidipsia/poliuria. Luego de varios exámenes, se diagnosticó enfermedad renal crónica (ERC) estadio IRIS III, con proteinuria moderada, lo anterior secundario a una glomerulonefritis inducida por leishmania. Luego de un mes de tratamiento, que incluyó el uso de marbofloxacino sumado a allopurinol, en conjunto con las recomendaciones para el manejo de la ERC proteinúrica según las guías IRIS, el paciente mostró evaluación clínica favorable, pero un empeoramiento de parámetros de laboratorio. Este es el primer reporte de ERC secundaria a leishmania en un perro en Chile.

Palabras claves: enfermedad renal crónica, leishmaniasis, glomerulonefritis.

Case Report: chronic kidney disease related with canine leishmaniasis in Chile.

Abstract

We describe the case of an eight-years-old male Beagle dog, with a history of lethargy, hyporexia, blepharitis, mild exfoliative dermatitis, superficial lymphadenopathy and polydipsia/polyuria. After several supplementary analyses, the diagnosis was a chronic kidney disease (CKD) stage IRIS III with moderate proteinuria, secondary to glomerulonephritis due to leishmania. After one month of treatment, which included marbofloxacin and allopurinol, together with the recommendations for the management of proteinuric CKD according with IRIS guidelines, the patient showed a favorable clinical evolution, but a worsening of the laboratory parameters. This is the first report of CKD in a dog secondary to leishmania in a dog in Chile.

Key words: chronic kidney disease, leishmaniasis, glomerulonephritis.

Introducción

La leishmaniosis canina (CanL) es una enfermedad zoonótica provocada por *Leishmania infantum*, un parásito de la familia *Trypanosomatidae*, en cuyo ciclo de vida intervienen mosquitos, principalmente del género *Phlebotomus* en Europa y África y *Lutzomyia* en América, a modo de vectores.¹ El hospedador definitivo es el ser humano, siendo los perros reservorios de este parásito. Esta enfermedad está expandida a más de 90 países y supone un problema para la sanidad pública en muchos de ellos.²

En América del Sur, el ciclo de este parásito ha evolucionado y adaptado, comprometiendo a diversas especies de mosquitos y mamíferos terrestres y arbóreos.³ Existen otras especies de

Leishmania además de *L. infantum*, como son *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. donovani* o *L. amazonensis*. La CanL está extendida a aquellos países con un clima propicio para la vida de sus vectores, como son Brasil, Colombia, Perú, Bolivia o Venezuela.¹ En el caso de Chile, se trata de un zona libre de esta enfermedad, sin embargo, el cada vez más frecuente movimiento de mascotas entre países hace que puedan presentarse casos de leishmaniosis en nuestras clínicas. Además, la transmisión puede ocurrir a través de transfusiones sanguíneas, transmisión vertical, venérea y algunas formas hipotéticas de transmisión como mordeduras o a través de garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* o pulgas,⁴ todas ellas posibles en este país. Así pues, es importante incluir esta enfermedad en nuestros diagnósticos diferenciales, reconociendo sus signos clínicos y

¹Médico Veterinario U. de Córdoba España. Master en Medicina, Sanidad y Mejora Animal, U de Córdoba. Residente 1er año, Hospital Veterinario de Santiago.

²Médico Veterinario. Dip Med Peq Anim, Dip Imag. Servicio de Medicina Interna Canina, Hospital Veterinario de Santiago.

siendo conscientes de las consecuencias que su fisiopatología pueda acarrear.

Las manifestaciones clínicas de la CanL son de tipo cutáneo y visceral, además de algunas inespecíficas como linfadenopatía generalizada, pérdida de apetito y peso, letargia y atrofia muscular. Es una enfermedad sistémica con un amplio espectro de gravedad: desde subclínica y autolimitante hasta formas severas de curso fatal. Así pues, las lesiones más frecuentes que podemos encontrar son del tipo dermatológico, siendo la dermatitis exfoliativa, úlceras y pustulas, hipotricosis u onicogriposis las más representativas. Existen también manifestaciones oftalmológicas con uveítis anterior, conjuntivitis, keratoconjuntivitis o blefaritis. Otras manifestaciones típicas de la enfermedad son la esplenomegalia, vasculitis, epistaxis, PU/PD, cojeras como consecuencia de poliartritis o polimiositis e incluso signos neurológicos. En los exámenes de laboratorio es muy destacable la hiperglobulinemia, representada como gammaglobulina policlonal, hipoalbuminemia, anemia no regenerativa, leucocitosis o linfopenia y trombocitopenia.⁴⁻⁶ Uno de los puntos más determinantes en la fisiopatología de la enfermedad es el desarrollo de nefritis y glomerulonefritis secundaria al depósito de complejos antígeno-anticuerpo.^{4,5,7,8} La lesión renal conduce a proteinuria de media a severa –con o sin síndrome nefrótico-, azotemia y enfermedad renal crónica (ERC), con las consecuencias sistémicas clásicas de la enfermedad como hipertensión arterial, pérdida de peso, hiperfosfatemia, acidosis metabólica, vómitos, diarrea o deshidratación.⁹⁻¹¹ El desarrollo de ERC ocurre en un gran número de casos de CanL, siendo la causa de muerte de muchos de ellos y condiciona las posibilidades terapéuticas ya que se debe evitar el uso de fármacos nefrotóxicos o que puedan agravar la condición del paciente.⁴ Los métodos diagnósticos de la enfermedad son de tipo parasitológico, con citología o histología, inmunohistoquímica o cultivo; serológicos, tanto cuantitativos (ELISA o IFI) como cualitativos mediante test rápidos; y diagnóstico molecular mediante PCR.⁵

La leishmaniosis se clasifica en cuatro estadios, de subclínica moderada a muy severa en base a título de anticuerpos en serología cuantitativa, hallazgos de laboratorio y los signos clínicos (Tabla 1).^{5,6} Los estadios más avanzados (III y IV) corresponden a aquellos pacientes que ya desarrollaron signos de ERC, en base a los criterios del IRIS sobre proteinuria y azotemia. La terapia para la enfermedad dependerá de su estadio. Así, se han descrito pautas para el tratamiento contra *Leishmania* y para el tratamiento de la ERC independientemente, según las recomendaciones existentes para tratamiento de enfermedad glomerular secundaria a infecciones.¹⁰ Los fármacos utilizados más frecuentemente para el tratamiento de leishmaniosis son el antimoniato de meglumine (100mg/kg iv o sc q 8-24h por

3-4 semanas), miltefosina (2mg/kg po q 24h por un mes) combinados con allopurinol (10mg/kg po q12h al menos seis meses).⁴ Otros fármacos alternativos son la domperidona, anfotericina B y fluoroquinolonas.⁴ El tratamiento para la ERC se establece según las recomendaciones del IRIS para cada estadio, e incluye control de la proteinuria mediante la inhibición del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), control de la hipertensión, cambio de dieta con restricción de proteína y fósforo, control de los parámetros renales (concentración de urea, creatinina y fósforo), y control y manejo del volumen hídrico del paciente para evitar la deshidratación.⁹ Además, como parte de la estrategia de lucha contra esta enfermedad existen métodos de prevención de contagio como los repelentes de insectos en aquellos lugares donde existen vectores, más recientemente el uso de vacunas o la instauración de un sistema de vigilancia, declaración obligatoria e incluso eutanasia en países donde el parásito es endémico.^{1,2,4-6}

Caso clínico.

Este reporte describe un caso de leishmaniosis con enfermedad renal crónica y síndrome nefrótico incompleto en un perro en Santiago de Chile.

Canino de ocho años, raza Beagle, 15 kg de peso, no castrado. Diagnosticado de leishmaniosis seis años atrás en Barcelona, España. Acude a consulta para revisión de su enfermedad, su propietario se mudó recientemente a Santiago de Chile. En la anamnesis describen al paciente levemente letárgico y con pérdida de apetito en las últimas semanas; además, ha tenido diarrea ocasional y PU/PD aparente en el último año. Los últimos exámenes laboratoriales se realizaron en julio de 2016, sin hallazgos relevantes. Desde que se diagnosticó la enfermedad no ha tenido otras patologías, su plan vacunal y antiparasitario está actualizado, no ha perdido peso y vive junto a otros perros indoor. El tratamiento recibido para la leishmaniosis consistió en un ciclo de 28 días de antimoniato de meglumine (100 mg/kg sc q24h) hace al menos cinco años y allopurinol (10 mg/kg po q12h) desde el diagnóstico de la infección hasta el día de hoy. El examen físico revela una condición corporal 4/5, temperatura 40°C, frecuencia cardíaca y respiratoria normales, y normotensión (PAS: 140 mmHg; <150 mmHg).¹¹ La temperatura disminuye al rango normal sin administración de antipiréticos 30 minutos después; el alza térmica se atribuyó a hipertermia por agitación. Como posibles signos clínicos de leishmaniosis, el paciente presenta blefaritis (foto 1), leve dermatitis exfoliativa, linfadenomegalia leve en poplíteos, preescapulares y submandibulares, y una leve dermatitis papular y comedones en la zona inguinal. No tiene historia de haber presentado otros signos típicos de la enfermedad como cojeras, epistaxis, ulceraciones cutáneas, alopecia o uveítis.



tiroidea T4 total fue de 0,89 µg/dl (rango 1,3-1,8 µg/dl) y el de TSH de 0,30 ng/dl (rango 0,1-0,5 ng/dl). El proteinograma evidenciaba una gammaglobulina policlonal, con aumento de las beta-globulinas (2,5 g/dl; rango 0,8-1,6 g/dl) y de las gamma-globulinas (2,4 g/dl; rango 0,5-1,8 g/dl) y una alta relación albúmina/globulina (índice A/G) de 0,4 (rango 0,6-1,5). En la ecografía se concluyó nefropatía bilateral con cambios difusos leves-moderados, esplenomegalia leve de aspecto inflamatorio crónico y linfadenopatía yeyunal e ilíaca de aspecto inflamatorio leve. La prueba serológica cualitativa por inmunocromatografía detectó anticuerpos anti-*Leishmania*, por lo que se consideró positiva. La gasometría venosa resultó normal. Radiografías de tórax sin cambios relevantes.

A la luz de los resultados, se diagnostica:
1) leishmaniasis estadio IV, 2) ERC estadio III del IRIS, proteinúrico sin síndrome nefrótico.¹² La disminución del valor de T4 se atribuyó a síndrome de enfermo eutiroideo.¹³ El plan terapéutico tuvo dos objetivos: limitar la progresión de la infección por leishmaniasis y retardar la progresión de la ERC. Respecto a la infección por *Leishmania* se indicó allopurinol (10 mg/kg po q12h), cuya función es leishmanistática, combinado con un ciclo de 28 días de marbofloxacino a 2 mg/kg po q12h, tratamiento de elección debido a los bajos efectos adversos que puede provocar y la capacidad para reducir la carga parasitaria y por consiguiente el título de anticuerpos. Para limitar la progresión de la ERC se siguieron las indicaciones entregadas por los consensos de IRIS según estadio por creatinina sérica y proteinuria: cambio a dieta renal, hidróxido de aluminio (60mg/kg/día), enalapril 5mg (0,25 mg/kg q24h), famotidina (1 mg/kg q12h), y clopidogrel (3mg/kg q24h; con una dosis de carga inicial de 10mg/kg).

En el control luego de un mes de tratamiento, el dueño describe una evolución favorable; el paciente recupera el ánimo y aumenta 800 grs de peso. El 70% de la ración es en base a dieta de prescripción renal y el otro 30% según fórmula casera,¹⁴ mantiene PD/PU leve y desaparecieron las manifestaciones oftálmicas. En la bioquímica, las proteínas totales estaban aumentadas proteínas totales (12,5 g/dl; rango 5,4-7,5 g/dl), leve empeoramiento de la hipoalbuminemia (2,4 g/dl; rango 2,8-4,0 g/dl) e hiperglobulinemia (7,89 g/dl; rango 2,7-4,4 g/dl), fósforo estaba elevado (5,7 mg/dl; rango 2,9-5,3 mg/dl), el calcio tenía un valor normal (10,0 mg/dl; rango 9,0-11,5 mg/dl); la concentración de creatinina sérica se encontraba aumentada (2,4 mg/dl; rango 0,4-1,8 mg/dl), aumento de nitrógeno ureico sanguíneo (79,21 mg/dl; rango 8,0-29,0 mg/dl) y colesterol normal (210 mg/dL; rango: 170-2309 mg/dL). Los niveles de enzimas hepáticas y concentración sérica de bilirrubina estaban dentro de rango, a excepción de la fosfatasa alcalina (FA) que presentaba un aumento discreto (277,4 UI/l; rango 90,0-205,0 UI/l). El uranálisis mostró una densidad urinaria de 1.020, proteinuria –según tira reactiva– de 100 mg/dl y ausencia de sedimento activo. El valor de UPC de 4,6 (normal: <0,6). El urocultivo resultó negativo. El nivel de hormona

ciclo de 28 días de marbofloxacino en las mismas dosis. Se realizaron los siguientes ajustes: enalapril (0,25 mg/kg q12h), hidróxido de aluminio (90 mg/kg po q24h). Se mantuvo la famotidina y el clopidogrel. Por último, se propuso un tratamiento inmunosupresor con Micofenolato (10 mg/kg q12h durante 60 días) como medida para disminuir el depósito de complejos inmunes y así reducir el avance de la glomerulonefritis. Sin embargo, el propietario del paciente no aceptó las posibles complicaciones que este tratamiento pudiera conllevar y decidió no aplicarlo. Se recomendó control del paciente en un mes.

Discusión.

El caso descrito ejemplifica cómo determinadas enfermedades infecciosas o parasitarias que no están presentes en nuestro territorio pueden llegar hasta nuestras clínicas. Aunque en Chile no hay presencia de los vectores propios de *Leishmania*, el movimiento entre países de perros portadores, relevante para la enfermedad en zonas de Europa,¹⁵ podría desencadenar el inicio de otras vías de contagio, las cuales podrían ayudar a diseminar la enfermedad, y si bien no tendrían la misma eficacia que la propia del ciclo de vida del parásito, no se puede conocer el alcance que pudieran tener con seguridad. Determinados supuestos son: la transmisión a causa de transfusiones sanguíneas en el caso de no conocer la seropositividad de un paciente donante¹⁶; el contagio de *Leishmania* por mordedura se ha descrito en un caso de un perro naturalmente infectado en Alemania¹⁷; la transmisión vertical transplacentaria, demostrada en perras,¹⁸ y propuesta como causa de la continuada incidencia de la enfermedad en Norte América¹⁹; la transmisión venérea descrita para la leishmaniosis canina visceral²⁰; y el hipotético contagio y diseminación del parásito a través de vectores de otras especies como pulgas y garrapatas, demostrando estas últimas transmisión transovárica.²¹⁻²⁶ Sería posible, por tanto, el contagio de *Leishmania* en el territorio de Chile, con las repercusiones en la salud pública que esta enfermedad puede llegar a tener, ya que se trata de una zoonosis que afecta a cientos de miles de personas cada año en todo el mundo.¹ Afortunadamente, en el caso de nuestro paciente contábamos con el diagnóstico previo, y las recomendaciones de prevención para el animal deberían ser útiles para disminuir la probabilidad de contagio.

El diagnóstico de leishmaniosis se fundamenta, como se explicaba previamente, en pruebas parasitológicas, serológicas o moleculares, además del reconocimiento de signología clínica. En los exámenes requeridos a nuestro paciente se incluyó una serología para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania*. El test realizado fue una inmunoanálisis que solo determinó la presencia cualitativa de estos anticuerpos. Está descrita la utilidad de la serología cuantitativa, por

ejemplo las técnicas IFAT, IFI o PCR en tiempo real, como método de confirmación y estadificación de la enfermedad, y como indicador del efecto del tratamiento sobre la carga parasitaria y deberían realizarse cada 6 meses.⁴⁻⁶ Además, existen estudios en los que se correlacionan las proteínas totales séricas y el título de IgG de *Leishmania* con las manifestaciones clínicas.²⁷ Esta condición fue por tanto limitante para la evaluación de la eficacia del tratamiento y futuro seguimiento del paciente y sería conveniente la implantación de estas técnicas cuantitativas por parte de los laboratorios en Chile. Otro método diagnóstico que puede ser de ayuda para los clínicos es la citología de aspirados con aguja fina de linfonodos, y aunque la sensibilidad de esta técnica no es muy alta (alrededor del 60%), pueden ser de utilidad en caso de sospecha.^{5,6} En estas citologías podemos encontrar hiperplasia linfoide y aumento de células plasmáticas, signos de inflamación piogranulomatosa con aumento de neutrófilos y macrófagos y evidencia o no de amastigotes de *Leishmania* intra o extracelulares.²⁸⁻³⁰ Entre nuestros exámenes también contamos con proteinograma; éste es de utilidad a la hora de monitorizar la enfermedad, al igual que otras reacciones inflamatorias o inmunes. En el caso de leishmaniosis, es frecuente encontrar gammaglobulina policlonal, definida por hipoalbuminemia tanto por ser una proteína de fase aguda negativa como por su pérdida glomerular concurrente; la región alfa aumentada discretamente por la presencia de proteínas de fase aguda positivas; y las regiones gamma y beta aumentadas significativamente debido a los altos títulos de anticuerpos y complejos inmunes circulantes.³¹

Uno de los signos que puede hacer sospechar de la infección por *Leishmania* u otro agente infeccioso es el inicio y/o avance rápido de enfermedad renal. Las lesiones descritas en perros con leishmaniosis se clasifican como glomerular, intersticial o tubular.^{7,8} En un estudio de patrones histopatológicos de nefropatía en perros con leishmaniosis visceral, en las del tipo glomerular identificaron glomeruloesclerosis segmental local (18,2%), glomerulonefritis membranoproliferativa (30,9%), glomerulonefritis semilunar (1,8%), glomerulonefritis crónica (1,8%) y otras anomalías glomerulares menores (14,5%).⁷ Estas lesiones pueden ser asintomáticas, o relacionarse con alteraciones funcionales (se describe hasta el 30-35% de proteinuria). La evolución fisiopatológica suele ser a largo plazo, dependiendo esta de la peculiaridad de cada huésped. En nuestro caso, la anamnesis daba indicios de una posible falla renal, que posteriormente confirmaron los exámenes. La pauta elegida se basó en los consensos publicados por el IRIS para enfermedad glomerular asociada a serología positiva¹⁰; en estos casos, se debe asumir la glomerulonefritis por depósito de complejos inmunes como evento subyacente a la proteinuria, iniciando un tratamiento antiinfeccioso aun sin la confirmación histopatológica por biopsia renal. Por

tanto, instauramos un tratamiento para la infección por *Leishmania* y un plan de control de la ERC basado en las recomendaciones del IRIS para enfermedad glomerular.⁹

Otro punto a considerar es la instauración de terapia inmunosupresora, con objeto de aliviar la glomerulonefritis. Basado en experiencia clínica preliminar, el micofenolato se considera la primera opción, teniendo pocos efectos secundarios graves. Otras drogas inmunosupresoras descritas son el clorambucilo en combinación con azatioprina, ciclofosfamida combinada con corticoides y ciclosporina.³² En el caso particular de leishmaniosis, el grupo LeishVet, que realiza en Europa las guías de la enfermedad,⁵ no menciona el uso de inmunosupresión como parte del tratamiento. Podría existir controversia ya que la leishmaniosis afecta directamente a células y órganos del sistema inmune e incluso a médula ósea, sin embargo no hay reporte a favor o en contra. En nuestro caso decidimos recomendar un tratamiento empírico dado el avance de la enfermedad renal y la ineficacia aparente de los tratamientos contra *Leishmania*. A pesar de que los efectos secundarios idiosincráticos del micofenolato no son severos, la incertidumbre acerca de cómo afectaría a la leishmaniosis hizo que el propietario no aceptara esta opción. Serían necesarios estudios en los que se probara la eficacia o no de este tipo de fármacos en la lucha contra el avance de la ERC, una de las causas más importantes de muerte en perros infectados con *Leishmania*.

Los tratamientos de primera elección para leishmaniosis son la combinación de allopurinol con antimonio de meglumine o miltefosina. Está descrita la eficacia de estos fármacos así como sus efectos adversos.⁴ El allopurinol, un fármaco utilizado para el tratamiento de la gota en humanos, se describe como leishmanistático, inhibiendo la síntesis proteica del parásito, y es usado en monoterapia o combinación con otras drogas. Es una terapia muy utilizada en la práctica clínica, obteniendo buenos resultados en la remisión de signos clínicos y reduciendo la carga parasitaria.^{4,33} Este fármaco no tiene efectos adversos sobre hígado o glomérulo renal,^{34,35} aunque puede causar la aparición de cristales de xantina en la orina.³⁶ La miltefosina ha demostrado ser muy eficaz, con hasta un 82,7% de perros con mejoría,³⁷ y en combinación con allopurinol consigue la remisión de signos clínicos hasta dos años, aunque no alcanzan a ser seronegativos.^{38,39}

Se han estudiado sus efectos adversos. Esta droga no es nefrotóxica, aunque sí se han observado vómitos, dolor intestinal, diarrea y anorexia.^{37,40,41} Estos efectos secundarios, si bien son leves o moderados, en un contexto de ERC podría agravar la deshidratación y alteraciones gastrointestinales ya existentes, por tanto no es una droga recomendada en casos de leishmaniosis en con afección renal. El antimonio de meglumine

tiene efectos leishmanicidas y, en combinación con allopurinol, es considerado el *gold standard* de los tratamientos contra *Leishmania*, obteniendo muy buenos resultados en cuanto a remisión de signos clínicos y carga parasitaria y título de anticuerpos.^{4,42-46} Sin embargo, este fármaco tiene algunos factores en contra, como su precio elevado y forma de administración subcutánea o intramuscular. Los efectos adversos que se han descrito incluyen desórdenes gastrointestinales como vómitos y diarrea hemorrágica y nefrotoxicidad tubular.^{40,41} Con más razón que la miltefosina, es una droga contraindicada en un paciente que ya desarrolló un fallo renal. Se justifica por tanto la búsqueda de alternativas terapéuticas cuando nos enfrentamos a un caso de leishmaniosis y azotemia asociada, como era nuestro caso. En la literatura se describen varias terapias alternativas, como la domperidona, aminosidina o amfotericina B,⁴ o antibióticos como el metronidazol⁴⁷ y las fluoroquinolonas. En el grupo de estas últimas, se ha comprobado que el marbofloxacino es capaz de eliminar amastigotes de *Leishmania* de los macrófagos de perro *in vitro*^{49,50} y se están realizando estudios en perros infectados naturalmente utilizando dosis de 2 mg/kg po q12h durante 28 días. Esta opción terapéutica no tiene efectos adversos sobre riñón⁴ lo cual posibilitaba su uso. A pesar de la experiencia previa con buenos resultados en el no avance de la ERC y disminución del título de anticuerpos, en esta ocasión los parámetros renales empeoraron y no fue posible realizar una serología cuantitativa. Así pues se decidió dar otro ciclo de marbofloxacino y quedar a la espera de la evolución del paciente, aunque el factor determinante en su pronóstico será el manejo y respuesta al tratamiento para ERC.

Como conclusión, la leishmaniosis es una zoonosis de interés mundial y repercusiones importantes en la salud pública que podría presentarse en Chile y diseminarse en determinadas circunstancias. En los perros causa una enfermedad crónica incurable que requiere tratamiento y monitorización a muy largo plazo, siendo la ERC una de las complicaciones más importantes ya que compromete la calidad y esperanza de vida del paciente. Es importante que los clínicos conozcan sus características y consideren la enfermedad en sus diagnósticos diferenciales, y que los laboratorios nacionales dispongan de métodos efectivos para la confirmación y cuantificación de la presencia del parásito. El papel de los clínicos de crucial para el control de la enfermedad en un territorio libre de ella y deberían conocer las alternativas terapéuticas según la fisiopatología de ella. Afortunadamente, existen multitud de estudios y grupos de consenso en zonas endémicas de *Leishmania*, lo cual permite un abordaje racional de esta patología si fundamentamos nuestra labor clínica en un estudio constante y actualizado.

Referencias bibliográficas.

1. Gramiccia M, Gradoni L: The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol*; 2005, 35(11-12): 1169-1180.
2. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L: Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*; 2008, 24(7): 324-330.
3. Assis N, Hisatugo F, Gomes T, Juarez J, Rosi K, Teodoro U. Considerations of potential vectors and animal reservoirs in an emerging cutaneous leishmaniasis area in São Domingos ranch, Paraná State in Southeast Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*; 2017, 59: 64.
4. Rosa M, Reguera, Morána M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*; 2016, 227: 98-114.
5. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi M, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*; 2011, 4:86.
6. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*; 2009, 165(1-2): 1-18.
7. Costa F, Goto H, Saldanha L, Silva S, Sinhorini, I, Silva T, Guerra L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniosis. *Vet. Pathol*; 2003, 40: 677-684.
8. Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, Nigrisoli E, Zanatta R, Tarducci A, Guaraci A. Glomerular lesions in dogs infected with Leishmania organisms. *Am J Vet Res*; 2003, 64:558-561.
9. Littman M, Daminet S, Grauer G, Lees G, van Dongen A. Consensus Recommendations for the Diagnostic Investigation of Dogs with Suspected Glomerular Disease. *J Vet Intern Med*; 2013, 27:19-S26.
10. Goldstein R, Brovida C, Fernandez-del Palacio M, Littman M, Polzin D, Zatelli A, Cowgill L. Consensus Recommendations for Treatment for Dogs with Serology Positive Glomerular Disease. *J Vet Intern Med*; 2013, 27:60-S66.
11. Brown S, Atkins C, Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M, Egner B, Elliott J, Henik R, Labato M, Littman M, D Polzin, Ross L, Snyder P, Stepien R. Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med*; 2007, 21 (3): 542-558.
12. Center SA et al. Clinicopathologic, renal immunofluorescent, and light microscopic features of glomerulonephritis in the dog: 41 cases (1975-1985). *J A Vet Med Assoc*; 1987, 190: 81-90.
13. Kantrowitz L, Peterson M, Melián C, Nichols R. Serum total thyroxine, total triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations in dogs with nonthyroidal disease. *Am Vet Med Assoc*; 2001, 219(6): 765-9.
14. Chew D, Dibartola S, Schenck P. *Canine and Feline Nephrology and Urology*. Second Edition. Elsevier. USA; 2011: 173.
15. Menn B, Lorentz S, Naucke T. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors*; 2010, 3: 34.
16. de Freitas E, Melo M, da Costa-Val A, Michalick M. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*; 2006, 137(12): 159-167.
17. Naucke T, Amelung S, Lorentz S. First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasit Vectors*; 2016, 9(1): 256.
18. Rosypal A, Troy G, Zajac A, Frank G, Lindsay D. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol*; 2005, 91(4): 970-972.
19. Boggiatto P, Gibson-Corley K, Metz K, Gallup J, Hostetter J, Mullin K, Petersen C. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis*; 2011, 5(4).
20. Silva F, Oliveira R, Silva T, Xavier M, Nascimento E, Santos R. Venereal transmission of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol*; 2009, 160(1-2):55-59.
21. Coutinho M, Linardi P. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniosis transfer the infection to other mammals?. *Vet Parasitol* 2007, 147(3-4):320-325.
22. Coutinho M, Bueno L, Sterzik A, Fujiwara R, Botelho J, De Maria M, Genaro O, Linardi P. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol*; 2005, 128(1-2):149-155.
23. Paz G, Ribeiro M, de Magalhaes D, Sathler K, Morais M, Fiúza V, Brandao S, Werneck G, Fortes-Dias C, Dias E. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Prev Vet Med*; 2010, 97(2):131-133.
24. Dantas-Torres F, Martins T, de Paiva-Cavalcanti M, Figueiredo L, Lima B, Brandao-Filho S. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Exp Parasitol*; 2010, 125(2):184-185.
25. Paz G, Ribeiro M, Michalsky E, da Rocha Lima AC, Franca-Silva J, Barata R, Fortes-Dias C, Dias E. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acar: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*; 2010, 106(2):523-528.
26. Proverbio D, Spada E, Bagnagatti de Giorgi G, Perego R, Valena E. Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. *Biomed Res Int*; 2014:412808.
27. Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis, A, Ferrer L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J. Comp. Pathol*; 2004, 130:7-12.
28. Mylonakis M, Papaioannou N, Saridomichelakis M, Koutinas A, Billinis C, Kontos V. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol*; 2005, 34:243-247.
29. Barrouin-Melo S, Larangeira D, Santos S, Chagas-Junior A, Paixao M, Aguiar P, dos-Santos W, Pontes-de-Carvalho L. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol*; 2006, 111:251-261.
30. Giunchetti R, Martins-Filho O, Carneiro C, Mayrink W, Marques M, Tafuri, W, Correa-Oliveira R, Reis A. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol*; 2008, 121:23- 33.
31. Paltrinieri L, Gradoni Xavier, Roura A, Zatelli E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniosis. *Vet Clin Pathol*; 2016, 1:27.
32. Segev G, Cowgill L, Heiene R, Labato M, Polzin D. Consensus recommendations for immunosuppressive treatment of dogs with glomerular disease based on established pathology. *J Vet Intern Med*; 2013, 27 (1):S44-54.
33. Pennisi M, Reale S, Giudice S, Masucci M, Caracappa S, Vitale M, Vitale F. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniosis with allopurinol. *Vet Res Commun*; 2005, 29(2):301-303.
34. Plevraki K, Koutinas A, Kaldrymidou H, Roumpies N, Papazoglou L, Saridomichelakis M, Savvas I, Leonides L. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med*; 2006, 20:228-233.
35. Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med*; 1999, 13(4):330-334.
36. Ling G, Ruby A, Harrold D, Johnson D. Xanthine-containing urinary calculi in dogs given allopurinol. *J Am Vet Med Assoc*; 1991, 198(11):1935-1940.
37. Woerly V, Maynard L, Sanquer A, Eun H. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol Res*; 2009, 105:463-469.
38. Miro G, Oliva G, Cruz I, Canavate C, Mortarino M, Vischer C, Bianciardi P. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*; 2009, 20(5-6):397-404.
39. Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, Gravino A. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Vet J*; 2009, 182(3):441-445.
40. Bianciardi P, Brovida C, Valente M, Aresu L, Cavicchioli L, Vischer C, Giroud L, Castagnaro M. Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. *Toxicol Pathol*; 2009, 37(6):770-775.
41. Mateo M, Maynard L, Vischer C, Bianciardi P, Miro G. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. *Parasitol Res*; 2009, 105(1):155-162.
42. Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone L, Gravino A. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*; 2008, 177(2):279-282.
43. Ikeda-Garcia F, Lopes R, Marques F, de Lima V, Morinishi C, Bonello F, Zanette M, Perri S, Feitosa M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol*; 2007, 143(3-4):254-259.
44. Ribeiro R, Moura E, Pimentel V, Sampaio W, Silva S, Schettini D, Alves C, Melo F, Tafuri W, Demicheli C. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*; 2008.
45. Torres M, Bardagi M, Roura X, Zanna G, Ravera I, Ferrer L. Long term follow-up of dogs diagnosed

with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*; 2011, 188(3):346-351.

46. Denerolle P, Bourdoiseau G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med*; 1999, 13(5):413-415.
47. Pennisi M, De Majo M, Masucci M, Britti D, Vitale F, Del Maso R. Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet Rec*; 2005, 156(11):346-349.
48. Farca A, Miniscalco B, Badino P, Odore R, Monticelli P, Trisciuoglio A, Ferroglio E. Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. *Parasitol Res*; 2012, 110: 2509–2513.
49. Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pino P, Mazier D, Woehrle F. Canine visceral leishmaniosis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology*; 2006, 135:137–146.
50. Farca A, Miniscalco B, Badino P, Odore R, Monticelli P, Trisciuoglio A, Ferroglio E. Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. *Parasitol Res*; 2012, 110: 2509–2513.