

Nodulações esplênicas: leishmaniose visceral canina?

Splenic Nodules: Canine Visceral leishmaniasis?

Gilsan Aparecida de Oliveira^{1,2}, Vitória Aline Santos Sarmiento², Isabelle Vanderlei Martins Bastos²,
Alberon Ribeiro de Araújo³, Lígia Buzzá Roo de Mendonça², Ana Paula Sampaio Feitosa⁴,
Fábio André Brayner^{1,4} & Luiz Carlos Alves^{1,4}

ABSTRACT

Background: Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a parasitic disease of high lethality caused by the protozoan *Leishmania infantum* in Brazil and is often related to splenomegaly. However, splenic nodules in dogs, although frequent, have not previously been reported as associated with CVL, but with neoplastic diseases. Considering that most dogs infected are oligosymptomatic or asymptomatic and that splenic nodules are common to other diseases, it is prudent to differentially diagnose CVL in view of its high zoonotic potential and lethality. The objective of the study was to describe a case of splenomegaly with splenic nodules associated with CVL in an asymptomatic dog treated with 2% miltefosina.

Case: A 5-year-old male Rottweiler with 41 kg, with a history of inappetence, apathy and weight loss was referred to the Veterinary Medicine School Clinic of the Cesmáq University Center, Maceió, AL, Brazil. However, during palpation a slight increase in the spleen was noted. Hematological, hemoparasite, biochemical and abdominal ultrasonographic examinations were requested to clarify the clinical suspicion of hemoparasitosis. The hematological and biochemical results respectively showed the following: normocytic normochromic anemia, hyperproteinemia and thrombocytopenia, in addition to hypoalbuminemia, with elevated total protein levels. The test for hemoparasites was negative. Ultrasonography showed mixed echogenicity suggestive of nodules. The rapid test for *Ehrlichia*, *Anaplasma* and *L. infantum* was performed. It was positive only for *L. infantum*. ELISA, IFAT and qPCR tests were performed to confirm the result. The test showed a cut-off result of 0.371 for ELISA, positive for RIFI at a cut-off of 1:40 and qPCR with less than 1 fg and with amplification above 36 cycles. In view of these results, treatment with 2% miltefosina at a dose of 1 mL/ 10 kg was started once a day, after feeding, for 28 days. The animal was monitored throughout treatment and re-evaluated every 10 days for 30 days, showing signs of clinical development, presenting satisfactory results.

Discussion: Canine splenomegaly can be associated with a variety of disease possibilities. In asymptomatic canine visceral leishmaniasis (CanL), the slight increase in spleen and the presence of splenic nodules may lead to a false diagnosis. Splenic nodules may be associated with dogs of advanced age and may be due to lymphoid nodular hyperplasia, which causes nodules with echogenicity, hyperechoic regions with well demarcated irregularity, with centralized hypoechoic areas and an absence of hematological and biochemical alterations. The cause of splenomegaly associated with nodules may be difficult to diagnose and require much time and effort. Therefore, diseases such as visceral leishmaniasis of high lethality must be the priority in differential diagnosis in endemic areas in order to minimize the risk of transmission. In addition to allowing an early intervention aiming at good animal health results and preventive measures, such as the use of repellent collars that reduce the risk of phlebotomo infection. The differential diagnosis of CVL is necessary in endemic areas, even in asymptomatic dogs that may present splenic alterations suggestive of other diseases. Treatment with 2% miltefosina was shown to be, in this case, effective at reducing the splenic nodules and a good alternative for the quality of life of the animal.

Keywords: *Leishmania*, splenomegaly, nodules, diagnosis, miltefosina.

Descritores: *Leishmania*, esplenomegalia, nódulos, diagnóstico, miltefosina.

DOI: 10.22456/1679-9216.108488

Received: 10 January 2021

Accepted: 30 May 2021

Published: 14 August 2021

¹Instituto Aggeu Magalhães (IAM) - FIOCRUZ-PE, Recife, PE, Brazil. ²Centro Universitário Cesmáq (CESMAC), Maceió, AL, Brazil. ³Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife. ⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE. CORRESPONDENCE: G.A Oliveira [deoliveira.gisan@gmail.com] & L.C. Alves [able.lcalves390@gmail.com]. Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ. Av. Moraes Rego s/n. CEP 50670-420 Recife, PE, Brazil.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é considerada uma das doenças negligenciadas mais relevantes da atualidade [12], em franca expansão com um crescente número de vetores e reservatórios [4]. Acredita-se que 350 milhões de pessoas estejam em situação de risco de infecção e estima-se que 2,5 milhões de cães estejam infectados apenas na bacia do mediterrâneo [1].

Na clínica médica veterinária ocupa lugar de destaque por sua alta letalidade e endemicidade. A variedade de sinais clínicos, muitas vezes inespecíficos ou simplesmente a ausência deles, torna o diagnóstico de *L. infantum* desafiador [9], podendo contribuir com o crescimento do número de cães e humanos infectados em área endêmica. Dentre a variedade de sinais clínicos a esplenomegalia é citada como uma alteração comum em cães infectados por *L. infantum* [2], porém também é uma alteração frequente em casos de hemoparasitoses como a erliquiose [5], doenças não infecciosas malignas como o hemangiossarcoma e sarcoma histiocítico que podem apresentar esplenomegalia e nodulações no baço [18] ou ainda, mais frequente, a hiperplasia linfóide nodular (NLH) que é uma das lesões esplênicas, não neoplásicas, mais comuns em cães, que pode levar também a esplenomegalia [8].

Desta forma, o diagnóstico diferencial, especialmente em cães assintomáticos infectados por *L. infantum*, permite a intervenção clínica precoce, a fim de obter redução das alterações esplênicas e da carga parasitária, contribuindo com a prevenção da infecção humana.

CASO

Um cão de 5 anos de idade, da raça Rottweiler, macho, pesando 41 kg, com histórico de inapetência, apatia e perda de peso foi atendido na Clínica Escola de Medicina Veterinária do Centro Universitário Cesmac (CESMAC), Maceió, AL. No exame clínico não foi observado nenhuma alteração nos parâmetros cardiorrespiratórios, temperatura e tempo de perfusão capilar. Entretanto, durante a palpação verificou-se um discreto aumento do baço. Foram solicitados exames hematológicos com pesquisa de hemoparasitas, bioquímicos e ultrassonográficos de abdômen, para esclarecer a suspeita clínica de hemoparasitoses. O animal foi reavaliado 7 dias após o atendimento. Os resultados hematológicos e bioquímicos mostraram respectivamente: anemia normocítica normocrômica, hiperproteinemia e trombocitopenia, além de hipoalbuminemia com aumento de

proteína total. Pesquisa de hemoparasitas negativo. A ultrassonografia mostrou ecogenicidade mista sugestiva de nódulos com textura heterogênea, bordas irregulares e vascularização preservada. Foi realizado o teste rápido imunocromatográfico Dual Path Platform (DPP®)¹ para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Para o diagnóstico de *Ehrlichia* e *Anaplasma* foi utilizado o teste rápido utilizando a tecnologia de ensaio imunossorbente (ELISA) para detecção de anticorpos contra *Ehrlichia* e *Anaplasma* chamado de canine Snap 4DX test (SNAP®-4DX)². Sendo positivo apenas para *L. infantum*. Para confirmação do resultado realizou-se o ensaio de imunoabsorção enzimática ou imunoenzimático (ELISA®)¹, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) *in house* utilizando lâminas sensibilizadas de amostras de cultura de promastigotas de *L. infantum* do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ - PE) e utilizado o segundo anticorpo marcado com fluoresceína (IgG anti-cão®)³ produzido em coelho. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi realizada utilizando o sistema LINF 1B, que detecta um fragmento de 132 pares de bases do kDNA do Complexo *L. donovani*. Foi utilizada a curva padrão de DNA genômico de *L. infantum* de 1 ng a 1 fg com fator de diluição de 10 e o controle negativo (amostra sem DNA). O volume final utilizado foi de 50 µL, sendo 25 de (SYBR® Green Master Mix)⁴, 1,0 µL do primer Linf 1B Forward (5'-TCCCAAACCTTTCTGGTCCT-3') e 1,0 µL do Primer Linf 1B Reverse (5'-TTACACCA-ACCCCAGTTTC-3'), 21 µL de água tipo 1 e 2 µL de DNA genômico de *L. infantum* [12]. O exame mostrou resultado bem acima do cut-off de 0,371 para o ELISA, positivo para o RIFI no cut-off de 1:40 e o qPCR com menos de 1 fg e com amplificação acima de 36 ciclos.

Diante destes resultados deu-se início ao tratamento com miltefosina à 2% (Milteforan 2%®)⁵, na dose de 1 mL/10 kg, uma vez ao dia, após a alimentação, durante 28 dias. O animal foi monitorado durante todo o tratamento e reavaliado a cada 10 dias, por 30 dias, apresentando sinais de evolução clínica.

Houve uma crescente melhora nos parâmetros hematológicos durante e após o tratamento (Tabela 1), demonstrando uma resposta positiva com discreto aumento de hemácias, hemoglobina e hematócrito. O quadro inicial de trombocitopenia regrediu, com as plaquetas atingindo os parâmetros de referência. Os leucócitos apresentaram-se dentro da normalidade,

com exceção dos monócitos e linfócitos, que mostraram discreto e expressivo aumento, respectivamente. Também foi observada evolução clínica, com melhora do apetite e disposição.

Os parâmetros bioquímicos se mantiveram sem alterações durante e após o tratamento, permanecendo com discreta hipoalbuminemia, hiperproteinemia e hiperglobulinemia (Tabela 2).

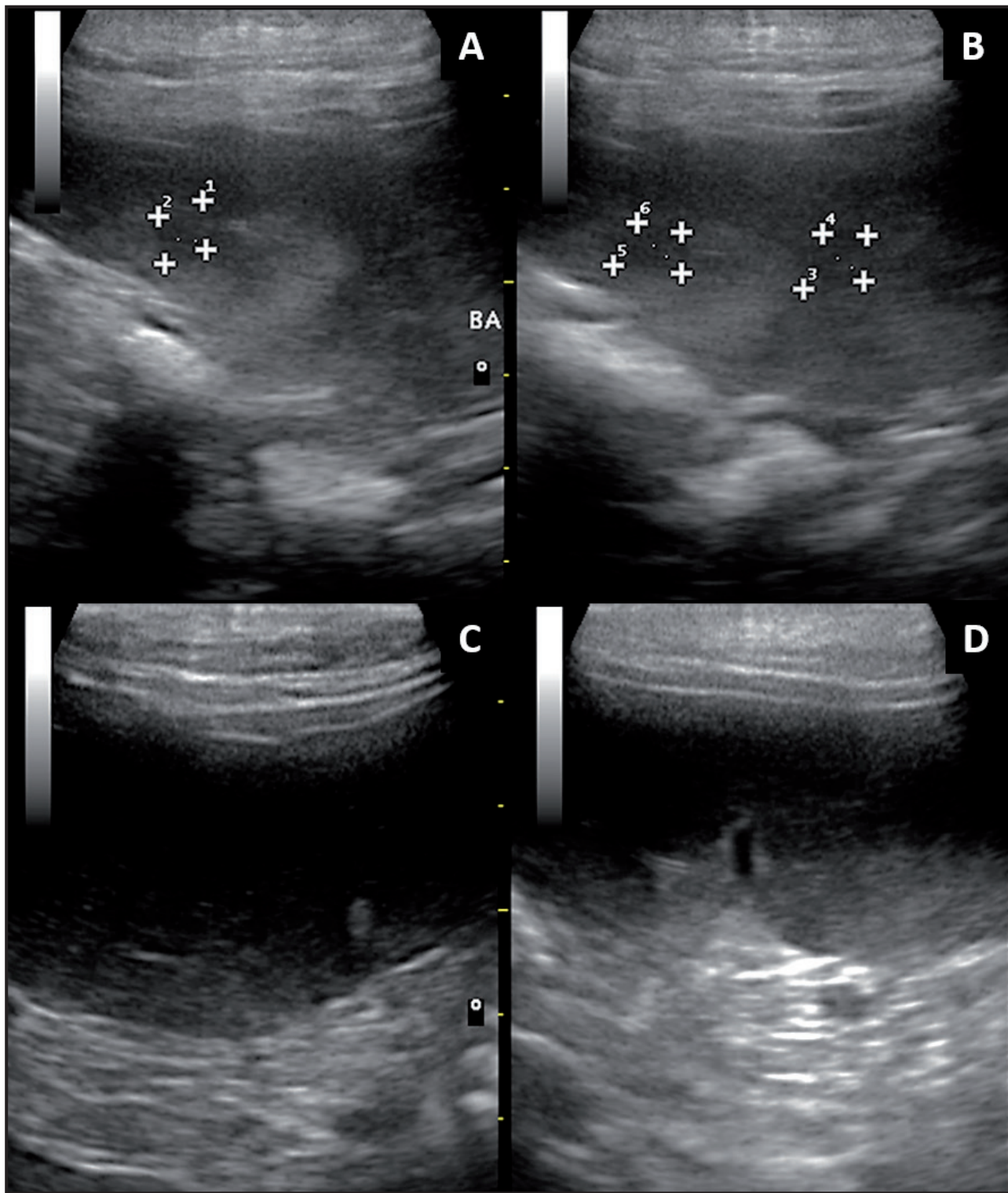


Figura 1. Ultrasson abdominal do baço do cão. A & B- Evidência da esplenomegalia e da presença de nódulos esplênicos (+) diâmetro antes do tratamento: +1 = 0,79 cm; +2 = 0,62cm; +3 = 0,89 cm; +4 = 0,67 cm; +5 = 0,81 cm; +6 = 0,72 cm. C & D- Observação de nódulos esplênicos 30 dias depois do tratamento com miltefosina 2%.

Tabela 1. Monitoramento hematológico durante e após o tratamento de 28 dias com miltefosina à 2%.

Parâmetro Hematológico	Monitoramento durante e após o tratamento (days)			Valores de referência
	10	20	30	
Eritrograma				
Eritrócitos (mil/mm ³)	4,81	5,05	5,28	5,5 a 8,5
Hemoglobina g/dL	10,7	11,0	11,7	12,0 a 18,0
Hematocrito (%)	32	34,6	36	37 a 55
VGM (u ³)	68	68	68	60 a 77
CHCM (g/dL)	32,8	31,7	32,3	30 a 36
Plaquetas				
Plaquetas (mil/mm ³)	245.000	299.000	295.680	200 a 500
Leucograma				
Leucócitos (mil/mm ³)	10.880	9.520	14.600	6.000 a 17.000
Basófilo (%)	1	0	0	0 a 3
Neutrófilos (%)	65	48	61	60 a 77
Eosinófilos (%)	6	6	6	2 a 10
Linfócitos (%)	23	40	30	12 a 30
Monócitos (%)	5	6	3	3 a 10

Tabela 2. Monitoramento bioquímico durante e após o tratamento de 28 dias com miltefosina 2%.

Parâmetro bioquímico	Monitoramento durante e após o tratamento (dias)			Valores de referência
	10	20	30	
Alanino aminotransferase (ALT)(UI L ⁻¹)	13	19	20	7,0 a 92,0
Creatinina (mg/dL)	1,26	1,21	1,01	0,5 a 1,6
Fosfatase Alcalina (FA) (UI L ⁻¹)	85,4	90,9	72,2	10,0 a 160,0
Urea (mg/dL)	27	30	24	10,0 a 60,0
Proteína Total (g/dL)	8,9	8,8	8,9	6 a 8
Albumina (g/dL)	2,01	2,42	1,94	2,3 a 3,8
Globulina (g/dL)	6,9	6,4	7,0	2,4 a 4,8

Tabela 3. Monitoramento sorológico durante e logo após o tratamento de 28 dias com miltefosina 2%.

Teste sorológico	Monitoramento durante e após o tratamento (dias)			Valores de Referência
	10	20	30	
Imunocromatográfico	Positivo	Positivo	Positivo	Forte reação de cor
ELISA	0,497	0,476	0,566	cutoff 0,371
RIFI	Positivo	Positivo	Negativo	cutoff 1:40

As análises ultrassonográficas mostraram que durante o tratamento o baço manteve-se com as mesmas alterações. Entretanto, ao término do tratamento foi observado que houve melhora em todos os parâmetros morfométricos e ausência das nodulações (Figura 1).

Com intuito de comprovar a cura da LVC, foi realizado o acompanhamento sorológico do animal durante e após o tratamento com miltefosina à 2%. Para tal, foi utilizado o teste imunocromatográfico (DPP®)¹, imunoenzimático (ELISA®)¹ e RIFI. Observou-se que o animal se manteve sorologicamente positivo durante todo o tratamento na maioria dos testes. No entanto, apresentou soroconversão após o tratamento no RIFI no cut-off de 1:40 (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A esplenomegalia canina pode estar associada a uma variedade de possibilidades de enfermidades. Na leishmaniose visceral canina (LVC) assintomática, o discreto aumento do baço e a presença de nodulações esplênicas, podem levar a um falso diagnóstico, apesar, da alta frequência da LVC acometer até 60% de cães soropositivos assintomáticos [3,13].

Dentre as enfermidades possíveis, a erliquiose também apresenta lesões esplênicas, assim como na LVC, que se dá através de mecanismos imunológicos desencadeando uma resposta inflamatória [6,7,14,15], justificando a importância da realização do diagnóstico diferencial. Diante disso, a ultrassonografia é importante na verificação de alterações esplênicas relacionadas ou não à presença de nódulos.

As nodulações esplênicas podem estar associadas a cães com idade avançada, podendo ser decorrente da hiperplasia nodular linfóide, que provocam nódulos com ecogenicidade, regiões hiperecóticas com irregularidade bem demarcadas, com áreas hipoeecóticas centralizadas e ausência de alterações hematológicas e bioquímicas [8]. Assim, essa alteração esplênica pode ser confundida com outras enfermidades que também desencadeiam alterações no baço, podendo levar a um diagnóstico errôneo. Apesar de toda similaridade com o caso, essa possibilidade foi descartada devido à pouca idade do animal e a presença de alterações hematológicas que não são observadas em cães com hiperplasia nodular linfóide.

Exames hematológicos também podem contribuir para o diagnóstico diferencial da LVC. Levando-se em consideração a ausência de sinais clínicos e a

presença da trombocitopenia antes do tratamento do caso, a LVC foi excluída do diagnóstico. Isto porque a LVC está presente maciçamente em cães com sinais clínicos de moderados a graves e trombocitopenia de moderada à grave causada por uma resposta imune estimulando anticorpos contra as plaquetas. Porém, podem estar presentes em cães com babesiose, dirofilariose, vasculite, falência renal [16], podendo mais uma vez induzir ao erro no diagnóstico.

Apesar dos dados hematológicos serem excelentes, exames complementares são necessários para o diagnóstico das hemoparasitoses, como os teste rápidos de imunocromatografia que apresentam boa acurácia, sensibilidade e especificidade quando comparado aos testes diretos de pesquisa de hemoparasitas [10]. Segundo estudos, a baixa sensibilidade do esfregaço permite falsos negativos [5]. Segundo os autores, a complementação com métodos sorológicos como RIFI e ELISA, por exemplo, têm maior sensibilidade. Corroborando desta forma, com as condutas tomadas no presente caso a fim de chegar a um diagnóstico rápido e preciso. No caso da LVC, a biópsia de medula é um método invasivo e com sensibilidade baixa, sendo assim, é mais utilizado e recomendado os testes rápidos, que devem ser confirmados pelo método de ELISA e associado com testes moleculares que possuem capacidade de detectar até 0,001 e 0,1 parasita/reação dependendo da amostra biológica utilizada. Sendo os cães assintomáticos mais difíceis de detectar devido a sua baixa carga parasitária, a técnica de qPCR é a sensível [17]. Tais afirmações corroboram com o presente estudo, onde o caso apresentou baixa carga parasitária, a qual pode ser justificada por se tratar de um cão assintomático e pela utilização da amostra sanguínea.

A causa da esplenomegalia associada às nodulações podem ser de difícil diagnóstico e demandar muito tempo e esforço. Logo, doenças como a leishmaniose visceral de alta letalidade precisa ser a prioridade no diagnóstico diferencial em áreas endêmicas a fim de minimizar o risco de transmissão. Além de possibilitar uma intervenção precoce que vise bons resultados à saúde do animal e medidas preventivas, como o uso de coleiras repelentes que diminuam o risco de infecção dos flebotomíneos.

MANUFACTURERS

¹Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos - FIOCRUZ. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, ME, USA.

³Sigma-Aldrich Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

⁴Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA.

⁵Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda. Sorocaba, SP, Brazil.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of

interest. The authors alone are responsible for the content and

writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Akhoundi M., Kuhls K., Cannet A., Votýpka J., Marty P., Delaunay P. & Sereno D. 2016.** A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 10(3): e0004349. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>.
- 2 Alanzi A.D., Puschendorf R., Alyousif M.S., Al-Khalifa M.S., Alharbi S.A., Al-Shehri Z.S., Said A.E., Alanazi I.O., Al-Mohammed H.I. & Alraey Y.A. 2019.** Molecular Detection of *Leishmania* spp. in Skin and Blood of Stray Dogs from Endemic Areas of Cutaneous Leishmaniasis in Saudi Arabia. *Iranian Journal of Parasitology*. 14(2): 231-239. DOI: <https://doi.org/10.18502/ijpa.v14i2.1135>
- 3 Brasil. Ministério da Saúde. 2006.** *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília: Ministério da Saúde, 120p.
- 4 Ferroglio E., Battisti E., Zanet S., Bolla C., Concialdi E., Trisciuglio A., Khalili S. & Biglino A. 2018.** Epidemiological evaluation of *Leishmania infantum* zoonotic transmission risk in the recently established endemic area of Northwestern Italy. *Zoonoses Public Health*. 65(6): 675-682. DOI: 10.1111/zph.12477.
- 5 Franco-Zetina M., Adame-Gallegos J. & Dzul-Rosado K. 2019.** Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. *Revista Chilena Infectología*. 36(5): 650-655. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000500650>.
- 6 Freire S.M., Campos A.P., Cavalcante R.R., Lindoso J.A.L. & Costa F.A.L. 2014.** Dinâmica das alterações do baço associadas ao estado clínico de cães com leishmaniose visceral. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 21(1): 27-32.
- 7 Martins N.S., Coelho G.B., Santos L.S., Oliveira R.A., Silva A.L.A. & Melo F.A. 2015.** Alterações da matriz extracelular esplênica em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. *Ciência Animal Brasileira*. 16(1): 103-115. DOI: <https://doi.org/10.1590/1089-68916i123500>.
- 8 Mangano C., Macrì F., Di Pietro S., Pugliese M., Santoro S., Iannelli N.M., Mazzullo G., Crupi R. & De Majo M. 2019.** Use of contrast-enhanced ultrasound for assessment of nodular lymphoid hyperplasia (NLH) in canine spleen. *BMC Veterinary Research*. 15(196): 1-9. DOI: 10.1186/s12917-019-1942-5.
- 9 Nogueira F.S., Avino V.C., Galvis-Ovallos F., Pereira-Chiocola V.L., Moreira M. A.B., Romariz A.P.P.L., Molla L.M. & Menz I. 2019.** Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites and Vectors*. 8(12): 79. DOI: DOI: 10.1186/s13071-019-3323-0
- 10 Oliveira B.F.S. 2019.** Existe concordância entre o nested pcr e o 4dx[®] plus no diagnóstico de erliquiose canina? 45f. Alegre, ES. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo.
- 11 Paiva-Cavalcanti M., Brito M.E.F., Souza W.V., Gomes Y.M. & Abath F.G.C. 2009.** The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* in canine blood. *The Veterinary Journal*. 182(2): 356-358. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.05.018.
- 12 Ribeiro C.R., Goncalves C.A., Cruz L.M. & Galera P.D. 2019.** Prevalence of visceral canine leishmaniosis and coinfections in periurban region in the federal district - Brazil. *Ciência Animal Brasileira*. 20(1-8): 1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v20e-49589>.
- 13 Rosário C.J.R.M., Dominici M.F., Braga M.S.C.O., Lima C.A.A., Pereira J.G. & Melo F.A. 2018.** Quantificação da IL-10 e do INF- γ em cães com ou sem sinais clínicos de infecção com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38(1): 129-132. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5107>.
- 14 Santana C.C., Freitas L.A.R.O., Santos G.G.S. & Washington L.C. 2019.** Disorganization of spleen compartments and dermatitis in canine visceral Leishmaniasis. *Surgical and Experimental Pathology*. 2(14): 1-8. DOI: 10.1186/s42047-019-0040-0.

- 15 **Silva M.V.M., Fernandes R.A., Nogueira J.L. & Ambrósio C.E. 2011.** Erliquiose canina: revisão de literatura. *Arquivo Ciência Veterinária Zoologia*. 14(2): 139-143.
- 16 **Terreazano G., Cortese L., Piantedosi D., Zappacosta S., Di Loria A., Santoro D., Ruggiero G. & Ciaramella P. 2006.** Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 110(3-4): 331-337. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.11.001>
- 17 **Travi B.L., Cordeiro-da-Silva A., Dantas-Torres F. & Miró F.G. 2018.** Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 12(1): 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.00060>
- 18 **Yankin I., Nemanic R., Funes S., Morais H., Gorman E. & Ruaux C. 2019.** Clinical relevance of splenic nodules or heterogeneous splenic parenchyma assessed by cytologic evaluation of fine-needle samples in 125 dogs (2011-2015). *Journal Veterinary Internal Medicine*. 34(1): 125-131.