

Leishmania

som årsag til Evans syndrom hos græsk gadehund

Beskrivelse af en immunmedieret anæmi og trombocytopeni med et længerevarende immunmedieret, polyartrotisk stadie, der højst sandsynligt skyldes Leishmania

[Anne Greisen]

**Dyrlæge,
Københavns Dyrehospital**

Leishmania spp. er protozoer, og sygdommen er en vektorbåren zoonose og forekommer i lande, hvor sandfluen (*Phlebotomus spp.*) kan leve. Hunden er reservoir for sygdommen, og mange hunde er raske smittebærere, hvorfor udbredelsen er stor (12 millioner mennesker på verdensplan) i endemiske områder.

I Danmark oplever vi hyppigst sygdommen hos hunde, der har færdes i middelhavslandene og ikke konsekvent er blevet profylaktisk behandlet mod stik fra sandfluen. *Leishmania infantum* er den almindeligste årsag til Leishmaniosis i middelhavslandene, men *L. Donovanii*, *L. Tropica*, *L. Aethiopica* og *L. Major* kan også være årsager.

Kliniske symptomer og patogenese

Generelt henvises til Greene - Infectious diseases.

Kliniske symptomer kan forekomme 3 måneder til 7 år efter infektion. Det menes, at immunologiske og genetiske forhold har indflydelse på, om infektionen manifesterer sig.

Pro-amistogoten overføres til værten via den inficerede sandflues munddele i forbindelse med dens blodmåltid og

optages i cirkulerende makrofager. Her udvikler den sig til amistogoter, der deler sig, og ved makrofagens død overføres disse til andre celler. Værtens immunologiske reaktion på dette er betydende for den videre udvikling⁴.

Klinisk kan der ske 1 af 3 ting: Akut infektion, kronisk infektion - men klinisk udbrud senere - eller at værten renser sig for protozoen. Parasittens tilstedeværelse medfører aktivering af det cellulære og humorale immunforsvar med lymfadenopathi og hyperglobinæmi til følge. Det er hovedsagelig de cirkulerende immunokomplekser, der giver de mangfoldige kliniske symptomer.

Ofte tales om en cutan, en mucocutan og en visceral form, men der er glidende overgange. De cutane forandringer er mest karakteriseret ved generaliseret alopecia, desquamation og sår i næsen, der kan give næseblod. De viscerale symptomer er hyppigst vægttab, organ dysfunktion og de fleste hunde dør på grund af nyreinsufficiens. De cirkulerende immunkomplekser kan også medføre immunmedierede sygdomme: polyarthritis, immunmedieret anæmi, trombocytopeni, vasculitis, uveitis, og glomerulonefritis¹.

Diagnose

Der bruges to principper i diagnostikken. 1) påvisning af antistoffer, der viser, at dyret er eller har været smittet med organismen, og 2) påvisning af or-

ganismen i kroppen, fx ved at påvise amistogoten i makrofagerne eller ved at påvise dens DNA med PCR (polymerase chain reaction) teknik.

Serumantistoffer vil næsten altid være til stede i klinisk syge hunde og til dels hos asymptomatiske bærere. Antistoffer kan måles ved ELISA tests, direkte og indirekte agglutinationstests samt western blotting. Almindeligvis angives en sensitivitet og specificitet på 80-100 % ved disse tests.

Identifikation af amistogoten frit eller i makrofager fra lymfeknuder, miltaspirater, hudprøver eller knoglemarv (fig. 1).

PCR (polymerase chain reaction) fra blod, væv, knoglemarv eller conjunctivalskrab er meget sensitiv. rt-PCR (realtime PCR) er en kvantitativ test og må ikke forveksles med RT-PCR reverse transcriptase PCR, der måler på RNA sekvenser. Rt-PCR kan angives i ct value, der betyder antallet af cyklusser, før organismen kunne påvises. En ct value på > 40 anses for negativ. Der er påvist en sensitivitet på PCR på conjunctivalskrab på klinisk syge hunde var 92 % og specificiteten 100 %. Prøverne var positive før dyret serokonverterede, og der var ingen falske positive i gruppen af raske dyr⁸.

Terapi

Allopurinol har en hæmmende effekt på protozoens multiplikation, dette må ofte gives i hele dyrets liv, da komplet remission er sjælden³. Baytril menes at kunne



bedre de kliniske symptomer². Glucantime er et meglumine antimoniate Sb 5+, der specifikt hæmmer protozoens enzymatiske processer. En lille del af det pentavalente antimoniat reduceres til det giftige Sb 3+, der ophobes i kroppen og kan medføre organskader. Hvis præparatet ikke gives over 2 måneder til dyr uden tegn på lever, nyrer eller hjerteinsufficiens, er risikoen minimal⁵.

Forebyggelse

Forebyggelse består i pour ons, der hindrer sandfluestik samt at holde dyrene inde, når solen er nede (1 time før og efter). Vacciner er under udvikling, og der er forsøg med både rekombinante vacciner, og vacciner baseret på hele parasitter^{3,6}.

Case

Græsk gadehund, intakt tæve »Mathilde«, 2 år, importeret til Danmark i januar 2007 i den tro, at papirerne var i

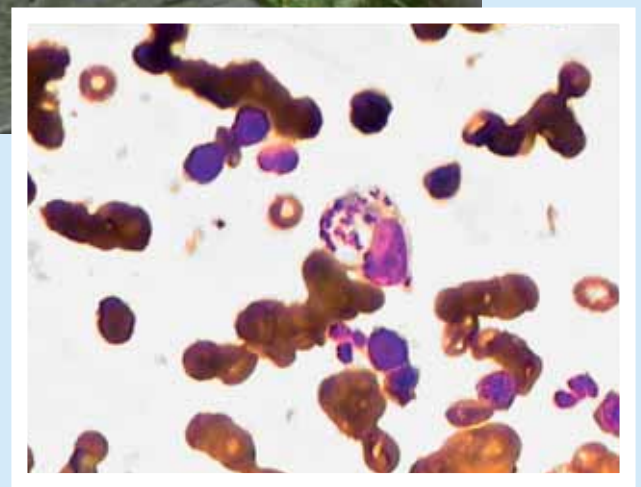
orden. Da hunden bliver syg nogle måneder senere, undersøger ejer dens papirer, og disse er tydeligvis upålidelige med hensyn til bl.a. Leishmania blodprøverne.

30/8-07

Henvist fra egen dyrlæge med anæmi og hæmoragisk diarre til blodtransfusion, da ejer modsætter sig eutanasi.

Historie: Hunden er behandlet med medrol i flere måneder pga. recidiverende ledproblemer. Steroiderne blev seponeret for 14 dage siden pga. mistanke om iatrogen cushing sygdom. For 3 dage siden fik hunden akut anæmi/trombocytopeni og hæmoragisk diarre. Dette blev behandlet med Ronaxan og Rimadyl.

Blodprøver: Anæmi (PCV: 13 %), trombocytopeni (PLT:?), leukopeni, bilirubinæmi, lav albumin.



Figur 1. *Leishmania amastigot* i knoglemarvsaspirat.

Klinisk undersøgelse: T: 37°C. Nedstemt, knap mobil, blege slimhinder, CFT: umålelig, tachycardi, tachypnoe, dehydreret, plaskelyde i abdomen og hæmorrhagisk diarre.

Yderligere udredning initialt: Anæmien karakteriseres som hæmolytisk og nonregenerativ. Mikrocytær og normocrom. Blod, serum og fæces (Snap Baermann neg) udtaget til analyser, in house og i Bristol Acarus og Vet Med Labor. Blodtype DEA 1.1 neg.

Initial problemstilling: Evans syndrom (immunmedieret anæmi og trombocytopeni), hæmragisk diarre. Koagulopati: Trombocytopeni og forlænget ApTT (aktivet partiel tromboplastin tid). Differentialdiagnoser: Infektøst: Erlichia (anaplasma/borrelia) babesia, rickettsia, leishmania, hepatozoon, angylostrogulus eller højst sandsynlig en kombination. Toksisk, neoplastisk mindre sandsynligt. Idiopatisk.

TX: Initial stabilisering med IV krystalloider og voluven, prednisolon i immun-supprimerende doser, Antepsin og Zantax.

31/8-07

Klinisk status: Velhydreret, blodtryk OK, men bleg og nedstemt. T: 37,4°C, fortsat blodig diarre, men spiser. HCT 9,9 % (10-55), PLT 58 10³/mm³ (150-200), WBC: 2,4 10³/mm³ (6-12). Fortsat mikrocytær, normocrom nonregenerativ anæmi. Mindre agglutination. TEG (tromboelastografi) (KU LIFE): Hypokoagel

TX: Blodtransfusion med 200 ml fuld-blod fra vores blodbank efter fuld cross match. Fortsat prednisolon, ronaxan og ventrikelprotektantia, (start omeprazol).

1/9-07

Klinisk status: Stabil, god appetit, fortsat blodig afføring, men det er ved at samle sig, T: 38°C, blege slimhinder CFT? Hæmatologi: HCT: 15,7 % (10-55), PLT: 108 10³/mm³ (150-200), fortsat < 1 % retikulocytter.

Klinisk kemi: Bilirubin: 24umol (2-10) Alb: 22 g/l (25-44) Tp:74 g/l (54-82), Glob: 51 g/l (23-52).

Fortsat medicinsk behandling.

2/9-07

Klinisk status: Frisk, spiser, ingen afføring. T: 38,5°C. PCV: 18 %. Fortsat medicinsk behandling

3/9-07

Klinisk status: Frisk, spiser har grødet/tynd afføring. T: 38,5°C. Hæmatologi: HCT: 15,9 % (40-55) PLT: 100 10³/mm³ (150-500) WBC: 11,3 10³/mm³ (6-12). Ingen autoagglutination, bedre regeneration: 1,5 % korrigeret. PCV: 20 %. Hjem på Prednisolon, Omeprazol, Antepsin, Ronaxan.

6/9-07 (kontrol)

Klinisk status: Meget bedre. TPR: OK. Hæmatologi: HCT 22,3 % (40-55) PLT: 243 10³/mm³, anicytose, granulocytose, monocytose. Ingen autoagglutination. Kun let regeneration.

Klinisk kemi: Tp 98 g/l (54-82), Alb 26 g/l, Glob: 72 g/l (23-52) Tbil: 12 umol/l (2-10) Alp: 356 U/l (20-150) ellers normale værdier.

Laboratoriesvar på blodprøver:

Erlichia canis ab, Borrelia ab, mikrofilaria (snap 3 DX): neg
Anaplasma ab: neg
Anaplasma/Erlichia PCR: neg
Babesia: neg
Leishmania ab: Pos (1:3200) ref <1:50
Leishmania real time PCR: POS ct value 27,39
Rickettsia PCR: Neg (senere prøve)

Laboratorie svar på fæcesprøver:

Angylostrogulus, og Crenosorum: neg

Behandling: Fortsat Prednisolon 2 mg/kg, Omeprazol, Antepsin. Ronaxan seponeres. Start Allopurinol. (20 mg/kg x 2). Tilladelse til Glucantime søgt.

10/9-07 (telefon konsultation)

Diarre og opkast (har drukket sæbevand).

11/9-07

Kontrol: Bedre igen - spist uden opkast. TPR: OK lyserøde slimhinder. Hæmatologi: HCT: 17,4 % (40-55), PLT: 330 10³/mm³, ingen anicytose kun let regeneration.

Klinisk kemi: Alp:421 U/l (20-150), Alt 186 U/l (10-118), Tp 94 g/l (51-82) Glob 69 g/l (23-52) i øvrigt iab.

13/9-07

Kontrol og knoglemarvaspirat og -biopsi. HCT: 22,8 % (40-55). Urin US: ia. Start på Baytril og Ronaxan igen.

18/9-07

Laboratoriesvar på knoglemarvaspirat og -biopsi: Amistogoter i makrofager - Leishmania (Fig. 1). Erytroid hypoplasi/eller myeloid hyperplasi. Let dysplasi.

20/9-07

Kontrol og start glucantimebehandling (100 mg/kg SC i 3 uger). Hæmatologi: HCT: 34 % (40-55), PLT: 626 10³/mm³

WBC: 14,9 10³/mm³ (6-12).

Klinisk kemi: Alp: 610 (20-150), Alt: 345 (10-118), TP: 95 (51-82) Glob: 64 (23-52). Prednisolon nedtrappes til 1 mg/kg.

28/9-07 (Almen OK)

Hæmatologi: HCT: 26,8 % (40-55), positiv autoagglutination igen.

Klinisk kemi: Alp: 732 U/l (20-150), Alt: 735 U/l (10-118), Tp: 88 g/l (51-82), Glob: 55 g/l(23-52). Prednisolon sættes op igen til 2 mg/kg.

3/10-07

Stranguri og hæmaturi, proteinuri. PCV: 29 %, urea, crea: normal. UrinUS: proteinuri, hæmaturi obs cystitis - glomerulonefrit. Ord. Clavubaktin.

5/10-07

Kontrol: almen vel. HCT: 26 % (40-55), WBC: 21 10³/mm³ (6-12). Alp 816 U/l (20-150), Alt: 594 U/l (10-118), øvrige iab:

10/10-07

Kontrol: almen vel. HCT: 26 % (40-55). Alp:709U/l (20-150), Alt: 453 U/l (10-118), Bun: 10 mmol/l (2-9) øvrige iab. Fortsat Prednisolon 2 mg/kg, Clavubactin, Allopurinol, Omeprazol og Antepsin. Glucantime kuren er slut.

15/10-07

Telefonkontrol: Prednisolon nedsættes pga. bivirkninger til 1 mg/kg. Ny portion Glucantime bestilles.

22/10-07

Kontrol: Så frisk som aldrig før! HCT: 34 % (40-55) ingen regeneration. Alp729 U/l (20-150), Alt: 700 U/l (10-118), Bun 13 mmol/l (2-9), fortsat prednisolon 1 mg/kg. Maveprotektantia seponeres, fortsat Allopurinol. Glucantimebehandling afventes. Shampooovask for diverse cruster i huden.

Laboratorisvar Leishmania PCR på blod (neg > 40). Knoglemarvsprøver af-talt.

5/11-07

Hct: 45 %, Alp: 483 U/l (20-150), Alt: 295 U/l (10-118), Bun: 20 mmol/l (2-9). Knoglemarvaspirat og -biopsi udtaget.

14/11-07

Laboratoriesvar PCR Leishmania knoglemarv: ct 41 (> 40 = neg). Myeloide/ Erytroide celler: 0,2:1 (ca.1:1) Erytroid hyperplasi og/eller myeloid hypoplasi. Allopurinol seponeret, prednisolon nedtrappes til 5 mg hver 2. dag i 8 dage.

22/11-07

Klinisk stadig vel, men alternerende ry-steture. Hæmatologi og klinisk kemi: iab

30/11-07

Urinundersøgelse: Proteinuri Prot/crea ratio: 7,7 (<0,5). Proteinelektroforese: Både IgG, albumin og mikroglobuliner. Start Fortecor.

3/12-07

Alluporinol startes igen 15mg/ kg x 2. Kontrol aftalt om 14 dage: Blod undersøges for Crea, Bun, PCV og C reaktiv protein; Urinundersøgelse for prot/crea.

Diskussion

Dette case er et usædvanligt tilfælde. Hunden havde i nogle måneder haft ledproblemer, der kunne holdes under kontrol med steroider. Årsagen til disse kunne være en immunologisk proces pga. Leishmaniainfektion, der får gode vækstmuligheder foranlediget steroiderne. Ingen andre kliniske tegn på Leishmania blev på noget tidspunkt fundet, og i startfasen fandtes ingen tegn på glomerulonefrose i form af proteinuri eller casts. Hyperglobunæmi opstod først nogle dage inde i det akutte forløb, men fortog sig efter en uges tid på behandling. Da hunden blev præsenteret på Københavns Dyrehospital, var det den immunmedierte hæmolytiske anæmi og trombocytopeni, der var hovedproblemer, og sekundært den hæmoragiske diarre.

Der blev ikke fundet tegn på co-infektioner, men disse kan stadig ikke udelukkes. Der kan dog ikke herske tvivl om, at Leishmaniainfektionen har spillet en rolle. Efter behandling i 2 måneder blev Leishmaniainfektionen slået tilbage, hundens erythropoese og hepatopati efter steroiderne normaliseret. Men der har udviklet sig en glomerulonefrit pga. cirkulerende immunkomplekser. Den mest almindelige dødsårsag hos Leishmania-inficerede hunde er nyre-

svigt. Visse undersøgelser peger på, at udskillelsen af proteiner i urinen kan nedsættes ved fortsat behandling med Allopurinol⁷. Matildes fremtid står pt. ud i det uvisse.

Efterskrift

Heldigvis kan sandfluen ikke leve og reproducere sig i Danmark, men der er rapporter om, at dens udbredelse spreder sig nordpå som følge af klimaændringer. Ligeledes er eksperimentel smitte med Leishmania foretaget via *Rhipicephalus sanguineus* (husflåten). Denne er kun set sporadisk i Danmark.

Sygdommen Leishmaniosis har uhyggelige konsekvenser for mennesker og dyr, selvom sygdommen kan helbredes hos mennesker. Derfor er det vigtigt, at vi ikke opfoster et reservoir blandt vore hunde ved at indføre smittede hunde fra middelhavsområderne. Som minimum bør disse hunde være testet seronegative evt. flere gange. En anden måde at screene dyrene for infektion/sygdom er en PCR test på conjunctivalskrab. Denne har en stor sensitivitet og specificitet og er positiv, før dyret serokonverterer 45-60 dage efter infektion⁸.

Efterfølgende har vi på Københavns Dyrehospital haft en hund med persisterende/intermitterende unilateralt næseblod over 3 måneder. Den kom også fra Grækenland og var testet negativ for Leishmania på en antistofmåling. Hunden blev undersøgt for andre vektorbårne sygdomme, aspergillosis, koagulopati, fremmedlegemer, neoplasier - bl.a. ved rhinoskopi og CT scanning - uden der fandtes en causa. Herefter blev serologien gentaget og PCR på øjensvab, og disse var begge positive. Dette er et eksempel på, at forekomst af antistoffer i blodet ikke altid er til stede på hunde, der er smittede og senere bliver klinisk syge. Det vil sige enten var de oprindelige laboratoriesvar falsk negative, eller også har hunden først serokonverteret efter ankomst til Danmark.

Det er også vigtigt, at vi orienterer alle vore klienter, der rejser sydpå, at de skal forebygge stik fra sandfluen på sig selv og på deres kæledyr, evt. ved at holde sig inde om natten.

Referencer

1. Greene: Infectious diseases of the dog and cat. 3. edition Saunders.
2. Bianciardi, P. *et al.* The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 93, 486-492 (2004).
3. Ikeda-Garcia, F.A. *et al.* Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol.* 143, 254-259 (2007).
4. Miranda, S., Martorell, S., Costa, M., Ferrer, L., & Ramis, A. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. *Vet Parasitol.* 144, 251-260 (2007).
5. Noli, C. & Auxilia, S.T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol.* 16, 213-232 (2005).
6. Parra, L.E. *et al.* Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 25, 2180-2186 (2007).
7. Plevraki, K. *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).
8. Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., & Baneth, G. Polymerase chain reaction using non-invasively obtained samples, for the detection of Leishmania infantum DNA in dogs. *J. Infect. Dis.* 189, 1729-1733 (2004).