

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



**Eva Černá**

Diagnostika leishmanióz u lidí a psů  
Diagnosis of leishmaniasis in humans and dogs

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Tatiana Spitzová, Ph.D.

Praha, 2020

**Charles University**  
**Faculty of Science**

Mé poděkování patří RNDr. Tatianě Spitzové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

#### Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13. 8. 2020

.....  
Eva Černá

## **Abstrakt**

Leishmanióza je závažné onemocnění lidí i zvířat, způsobené parazitickými prvky. U lidí má toto onemocnění viscerální, kožní a mukokutánní formu, přičemž neléčená viscerální leishmanióza je smrtelná. V diagnostice jsou zatím nejčastěji využívány klasické parazitologické metody, založené na histocytologické analýze. V posledních letech však došlo ke značnému rozvoji serologické i molekulární diagnostiky. Tato rešerše je tak zaměřena na popsání a vzájemné porovnání tradičních i nových diagnostických metod. Pozornost je věnována primárně metodám novým, tedy serologickým a molekulárním. Porovnávají jsou především rozdíly v senzitivitě, specifitě, možnosti využití v terénu nebo finanční a časová náročnost. V práci je uvedena diagnostika u lidí i u psů, neboť psi jsou význačným rezervoárem.

## **Klíčová slova**

leishmanióza, diagnostika, parazitologie, lidé, psi, metoda, molekulární, serologické, senzitivita, specifita

## **Abstract**

Leishmaniasis is a serious disease caused by parasites that affects both people and animals. In people, this disease has three forms, cutaneous, mucocutaneous and visceral form. Visceral form is lethal if it's left untreated. Leishmaniasis is usually diagnosed by using regular parasitological methods based on histocytological analysis. In the last few years, there has been a considerable progress in serological and molecular diagnostics. This thesis focuses on description and comparison of the traditional and the new diagnostic methods. Attention is paid primarily to the new methods, therefore serological and molecular. These methods are compared by their sensitivity, specificity, field application potential, financial costs and time consumption. Both human and canine diagnostics are mentioned due to the fact that dogs are a significant reservoir.

## **Key words**

leishmaniasis, diagnostics, parasitology, humans, dogs, method, molecular, serological, sensitivity, specificity

## Seznam použitých zkratk

3D	three-dimensional	trojdimenzionální
AFLP	amplified fragment length polymorphism	polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů
cPCR	conventional polymerase chain reaction	konvenční PCR
DAT	direct agglutination test	přímý aglutinační test
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	imunoenzymatická metoda
FAST	fast agglutination screening test	rychlý aglutinační test
FAT	fluorescent antibody test	fluorescenční test
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HRM	high resolution melt	vysokorozlišovací analýza křivek tání
ICT	immunochromatographic test	imunochromatografický test
IFAT	indirect immunofluorescence antibody test	nepřímý imunofluorescenční test
IGRA	interferon gamma release assay	test založený na uvolnění interferonu $\Gamma$
kDNA	kinetoplast DNA	kinetoplastová DNA
KL	cutaneous leishmaniasis	kožní leishmanióza
LAMP	loop-mediated isothermal amplification	izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou
LAT	latex agglutination test	latexový aglutinační test
LST	leishmanin skin test	leishmaninový kožní test
MLEE	multilocus enzyme electrophoresis	multilokusová enzymová elektroforéza
NASBA	nucleic acid sequence-based amplification	amplifikace založená na sekvenci nukleových kyselin
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PKDL	post-kala-azar dermal leishmaniasis	post-kala-azarová dermální leishmanióza
qPCR	quantitative PCR	kvantitativní PCR
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA	náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA
RDT	rapid diagnostic test	rychlý diagnostický test
RFLP	restriction fragment length polymorphism	polymorfismus délky restričních fragmentů
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
VL	visceral leishmaniasis	viscerální leishmanióza
WHO	world health organization	světová zdravotnická organizace

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Charakteristika rodu <i>Leishmania</i> .....	2
2.1 Historie .....	2
2.2 Taxonomie rodu <i>Leishmania</i> .....	2
2.3 Přenašeči .....	2
2.4 Životní cyklus.....	3
3. Leishmanióza.....	4
3. 2 Viscerální leishmanióza .....	4
3. 3 Kožní leishmanióza .....	5
3. 4 Mukokutánní leishmanióza .....	5
4. Parazitologické metody .....	7
4. 1 Parazitologické metody u lidí .....	7
4. 2 Parazitologické metody u psů.....	8
5. Serologické metody.....	9
6. Molekulární metody .....	15
7. Závěr .....	23
Seznam literatury .....	26

## 1. Úvod

Leishmanióza je choroba, kterou Světová zdravotnická organizace zařadila na seznam takzvaně opomíjených tropických onemocnění. V současnosti jde o druhé parazitární onemocnění s nejvyšší úmrtností. V žebříčku se tak objevuje hned za malárií (shrnuto v Ghorbani, M. & Farhoudi, R., 2017). Vzhledem k dopadu na lidské zdraví a z toho i vyplývajících ekonomických ztrát, byla leishmanióza zařazena mezi parazitární onemocnění s nejvyšší prioritou výzkumu (WHO, 2010). Přesto se však v rámci její diagnostiky využívají především klasické parazitologické metody. Ačkoli jsou tyto metody stále považovány za zlatý standard, pojí se i se spoustou nevýhod. Často jde o metody invazivní a pro pacienty tak značně nekomfortní. Další jejich nevýhodou je poměrně nízká schopnost zachycení přítomnosti daného onemocnění – tzv. senzitivita. V neposlední řadě je jejich problémem i relativně nízká specifita, při které jsou testované vzorky falešně negativní (shrnuto v Srivastava, P. et al., 2011).

V posledních letech tak došlo ke vzniku a rozvoji nových diagnostických metod. Kromě klasických parazitologických metod se objevily a začaly využívat i metody serologické a molekulární. Ve svojí práci bych se proto ráda zaměřila na popsání a porovnání jednotlivých metod diagnostiky a to jak u lidí, tak i u psů, kteří jsou významným přirozeným rezervoárem. Hlavním cílem této práce tedy bude popsání principů, na kterých klasické i nové metody fungují a dále jejich porovnání z hlediska senzitivity, specifity, náročnosti provedení, ceny i možnosti využití v terénu.

## 2. Charakteristika rodu *Leishmania*

### 2.1 Historie

Organismy příbuzné rodu *Leishmania* se objevovaly již v pravěku. Ve fosilním záznamu můžeme nalézt dvě fosilie staré přibližně 100 milionů let. Nalezeny byly v zažívacím ústrojí samice krev sajícího hmyzu *Palaeomyia burmitis*, který dnes již patří mezi vyhynulé. První písemné záznamy o leishmanióze se pak objevují v antice v 7. století před naším letopočtem v asyrské knihovně. První odborné články o leishmanióze byly publikovány v 19. století. K detailnímu popsání rodu *Leishmania* došlo roku 1903 Charlesem Donovanem a Wiliamem Leishmanem (shrnutí v Steverding, D., 2017).

### 2.2 Taxonomie rodu *Leishmania*

Rod *Leishmania* se zařazuje do říše *Excavata*, kmene *Euglenozoa*, třídy *Kinetoplastida* a řádu *Trypanosomatidae* (Maurício, I. L., 2018). Skupina *Leishmania* se dále dělí na podskupiny *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* a *Mundinia* (Espinosa, O. A. et al., 2018). Skupina *Mundinia* obsahuje i patogeny nebezpečné člověku, přesto však zatím není dostatečně prostudovaná. K ustanovení této skupiny došlo teprve nedávno (Serenio D., 2019). Celkem bylo popsáno minimálně 39 druhů leishmáníí, ale ukazuje se, že některé popsané druhy jsou zřejmě totožné. Počet druhů je tedy zatím nejasný (Maurício, I. L., 2018).

Zástupci se do jednotlivých skupin dříve řadili na základě ekobiologických kritérií, tedy například podle jejich geografického rozšíření, způsobu přenosu, epidemiologických dat a klinického obrazu. Dnes jsou zástupci zařazováni do skupin na základě imunologických a biochemických analýz (Schönian, G. et al., 2010).

### 2.3 Přenašeči

Přenašeči savčích leishmáníí jsou krev sající samičky rodu *Phlebotomus* (Starý svět) a *Lutzomyia* (Nový svět). Z rodu *Phlebotomus* je to celkem 42 různých druhů a z rodu *Lutzomyia* pak 56 druhů (shrnutí v Marolli, M. et al., 2013). Ukazuje se, že přenašeči savčích leishmáníí by mohli být i zástupci z rodu *Sergentomyia* (Starý svět), kteří byli dlouhou dobu považováni za přenašeče pouze u plazů. Pro potvrzení je ale nutné provést další výzkumy (shrnutí v Maia, C. & Depaquit, J., 2016).

Flebotomy můžeme najít téměř na všech kontinentech. Ti z Nového světa se vyskytují spíše v oblastech s vysokou vlhkostí, zatímco ti ze Starého světa preferují sušší podnebí. Flebotomové se zatím vyskytují převážně v tropickém pásu, ale neustále dochází k rozšiřování jejich areálu (shrnutí v Sharma, U. & Singh, S., 2008). V Evropě se nacházejí v subtropickém pásu ve Středomoří (Alten, B. et al., 2016). Odchyt flebotoma však byl zaznamenán již i na Slovensku (Dvorak, V. et al., 2016). Je pravděpodobné, že spolu s pokračujícími klimatickými

změnami bude docházet k rozšíření do mírného pásu. Spolu s tím bude pravděpodobně spojeno riziko zavlečení leishmaniózy do Střední Evropy (Fischer, D. et al., 2010).

## 2.4 Životní cyklus

V životním cyklu leishmání se střídají dvě formy, amastigotní a protomastigotní. Amastigot je bezbičíkatá forma, dlouhá 2,5 až 3,5 mikrometru, nacházející se uvnitř fagocytujících buněk obratlovčího hostitele. Pokud na nakaženém hostiteli saje krev samička flebotoma, nasaje toto stádium spolu s krví. Uvnitř střeva samičky, která funguje jako vektor, pak dochází k přeměně amastigota na stádium protomastigota. Protomastigotní forma je bičíkatá a dlouhá 12 až 20 mikrometrů. Protomastigoti se do obratlovčího hostitele dostávají díky regurgitaci ve chvíli, kdy samička opět saje krev. V hostiteli jsou následně fagocytováni makrofágy, uvnitř kterých dochází k přeměně na amastigotní stádium (shrnutí v Torres-Guerrero, E. et al., 2017).

Leishmání dokáží ovlivňovat to, jak často samice saje krev. V přední části její trávicí soustavy vytvářejí speciální gelovou zátku, která znesnadňuje trávení a způsobuje regurgitaci. Nakažené samičky kvůli tomu tak obvykle sají na více hostitelích v průběhu krátkého časového úseku. Tímto způsobem se leishmání z jedné nakažené samičky mohou dostat do více hostitelů (shrnutí v Ready, P. D. & Rogers, M. E., 2013).



### 3. Leishmanióza

Leishmanióza je onemocnění, které způsobuje více jak 20 druhů parazitických prvoků rodu *Leishmania*. Jedná se o onemocnění, které je rozšířené téměř ve 100 zemích světa, nacházejících se v tropických a subtropických oblastech (shrnutí v Burza, S. et al., 2018). V současnosti je touto chorobou ohroženo okolo 350 milionů lidí. Každý rok se nově nakazí další 1,5 – 2 miliony. Ročně kvůli tomuto onemocnění zemře okolo 70 000 lidí. Leishmanióza má tři formy – viscerální, kožní a mukokutánní (shrnutí v Torres-Guerrero, E. et al., 2017).

Leishmanióza se vyskytuje především v rozvojových zemích a bývá nazývána chorobou chudých. Kromě lidí mohou prvoci rodu *Leishmania* infikovat přibližně 70 zvířecích druhů (WHO, 2020). Nejvýznamnějším zvířecím rezervoárem jsou psi, u kterých se objevuje viscerální i kožní forma (shrnutí v Ayele, A. & Seyoum, Z., 2016).

#### 3. 2 Viscerální leishmanióza

Viscerální forma (VL) je nejzávažnější a dochází při ní k napadení vnitřních orgánů, postiženy jsou především játra a slezina. Tato forma bývá označována jako kala azar, což znamená černá horečka. Toto označení pochází z hindštiny a odkazuje na vysoké horečky, které jsou při této formě leishmaniózy přítomné (shrnutí v Burza, S. et al., 2018). Viscerální leishmaniózu způsobuje *L. donovani* (Indie a východní Afrika), *L. infantum* (Středomoří), *L. chagasi* (Jižní Amerika) a výjimečně i *L. tropica* (Jižní Amerika a Střední východ). Mezi nejohroženější skupiny patří jedinci s oslabenou imunitou, podvyživení jedinci a předškolní děti. Inkubační doba se u viscerální leishmaniózy pohybuje mezi 3 až 8 měsíci. Neléčená viscerální leishmanióza končí smrtí (shrnutí v Torres-Guerrero, E. et al., 2017). VL je viditelná na obrázku 1C.

S viscerální leishmaniózou souvisí post kala – azarová dermatitida. Ta je obvykle způsobena *L. donovani*, nicméně ve výjimečných případech může být způsobena i *L. infantum* (Bhandare, P. et al., 2014). Jde o kožní infekci, která se objevuje u 2,5 – 20 % pacientů po prodělání VL. Tato infekce není na rozdíl od VL smrtelná, snižuje však kvalitu života pacientů. Ti s ní většinou musejí žít mnoho let. PKDL je dvojího typu, při makulárním typu na kůži vznikají skvrny, u nodulárního typu pak vznikají kožní novotvary ve formě jakýchsi uzlíků (Le Rutte, E. A. et al., 2019). Největší nebezpečí však spočívá v tom, že pacienti s PKDL mohou být dlouhodobým zdrojem nákazy pro ostatní. Výzkumy ukázaly, že infekčnost u pacientů s PKDL je velmi podobná jako u aktivní VL. PKDL tak pravděpodobně maří snahy o eliminaci VL (Mondal, D. et al., 2019).

Viscerální leishmanióza u psů je systémové onemocnění vyznačující se širokou škálou projevů. Nejčastější je takzvaně kožně-viscerální forma způsobená *L. infantum* (shrnutí v Ribeiro, R. R. et al., 2018). Mezi její klinické příznaky patří například zvětšení lymfatických uzlin, apatie, nechutenství, ztráta hmotnosti, zvětšení sleziny, horečka, zvracení či průjem. V

neposlední řadě se pak u psa objevují kožní léze. Ty se vyskytují primárně na hlavě, nejvíce zasaženy bývají uši a čumák (obrázek 1D). V některých případech se však vyskytují i na zbytku těla, například na tlapkách. Častá bývá také alopecie, tedy ztráta srsti (shrnutí v Solano-Gallego, L. et al., 2011).

Nakažení psi jsou tak hlavním rezervoárem *L. infantum*. Terapie vede k odstranění klinických příznaků, ale pes může dál zůstat přenašečem. Parazitémie však bývá nízká a přenos nákazy je tak málo pravděpodobný. Ve vyspělých zemích bývají psi obvykle léčeni, v rozvojových státech je naopak doporučována eutanazie (shrnutí v Travi, B. L. et al., 2018). Inkubační doba je velmi variabilní a může být v řádu měsíců až let (Munstermann, L. E., 2019).

### 3. 3 Kožní leishmanióza

Kožní leishmaniózu způsobuje *L. tropica* (Středomoří, severní Afrika, Střední východ), *L. aethiopica* (Etiopie a Keňa), *L. major* (Střední východ, severní a západní Afrika, centrální Asie), *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* (Jižní Amerika), výjimečně pak i *L. infantum* ve Středomoří, Střední a Jižní Americe a v Číně (shrnutí v Burza, S. et al., 2018).

Jedná se o nejrozšířenější druh leishmaniózy, při kterém dochází k poškození kůže v různém rozsahu – nejčastěji se na kůži objevují vředy a vyrážka (shrnutí v Mokni M., 2019). Poškození kůže je viditelné na obrázku 1A. Pokud je KL způsobena druhem *L. major*, vznikají vlhké vředy. Léze zde obsahuje pouze malé množství parazitů. Tento typ má krátkou inkubační dobu a snadno se hojí. U KL způsobené *L. tropica* dochází ke vzniku suchých vředů. Ty jsou naopak špatně hojitelné, mají dlouhou inkubační dobu a vysokou parazitémii (Manfredi, M. & Iuliano, S., 2016). Tento typ leishmaniózy není život ohrožující. Více než 90 % lidí nakažených kožní leishmaniózou žije v Afganistánu, Saudské Arábii, Alžírsku, Brazílii, Peru, Iránu, Iráku, Sýrii a Súdánu (shrnutí v Mokni M., 2019).

U psů může být kožní leishmanióza velmi výjimečně způsobena druhy *L. major* nebo *L. tropica* (Baneth, G. et al., 2017).

### 3. 4 Mukokutánní leishmanióza

Mukokutánní leishmanióza také postihuje kůži, ale na rozdíl od kožní leishmaniózy je tato forma závažnější. U pacientů se objevují hluboké rány v oblasti obličeje, které se špatně hojí. Zasažená sliznice je viditelná na obrázku 1B. Nejvíce postižena bývá sliznice nosu, úst a krku (shrnutí v Marra, F. et al., 2014). Více než 90 % lidí nakažených mukokutánní leishmaniózou žije v Bolívii, Brazílii, Etiopii a Peru (WHO, 2020). Tento typ leishmaniózy může pacienty ohrožovat na životě (shrnutí v David, C. V. & Craft, N., 2009). Mukokutánní leishmanióza je způsobena druhy *L. brasiliensis* a *L. guyanensis* (shrnutí v Burza, S. et al., 2018).



Obr. 1: Klinické projevy leishmaniózy.

A – Muž trpící kožní leishmaniózou. Převzato a upraveno z [Burza, S. et al., 2018](#).

B – Mukokutánní leishmanióza, nekrotický vřed zasahující nos, vrchní ret a horní patro. Převzato a upraveno z [Crovetto-Martínez, R. et al., 2015](#).

C – Dítě trpící viscerální leishmaniózou. Převzato a upraveno z [WHO, 2014](#).

D – Léze na čenichu psa trpícího kožní leishmaniózou. Převzato a upraveno z [Solano-Galleno, L. et al., 2011](#).

## 4. Parazitologické metody

Parazitologické metody spočívají v odběru tkáně a následném rozpoznání parazita pod světelným mikroskopem. Parazitologické metody jsou metody klasické a tento způsob diagnostiky je využíván nejčastěji (shrnutí v Sundar, S. & Rai, M., 2002).

Z odebrané tkáně se vytváří vzorek, který je obvykle obarven Giemsovým barvivem. Po obarvení dochází k fixaci a následné mikroskopické analýze. V případě pozitivního vzorku lze v buňkách pozorovat kinetoplast a jádro amastigotů, která jsou zbarvena červeně, případně dofialova (shrnutí v Srivastava, P. et al., 2011). Také je možné vytvořit in vitro kulturu, při správném provedení se pak může dosáhnout 100% senzitivity. Nevýhoda tvorby in vitro kultur však spočívá v tom, že jsou finančně nákladné, vyžadují kvalitní laboratorní zázemí, proškolený personál a navíc jsou časově náročné (shrnutí v Singh, O. P. & Sundar, S., 2015).

Při použití parazitologických metod nelze zjistit, jakým druhem leishmanií je jedinec nakažený. Pro zjištění konkrétního druhu je tak potřeba využít jiných metod, většinou se využívají metody molekulární (shrnutí v Akhoundi, M. et al., 2017).

### 4. 1 Parazitologické metody u lidí

U viscerální leishmaniózy dochází k odběru tkáně ze sleziny, kostní dřeně, nebo lymfatických uzlin (shrnutí v Davies, C. R. et al. 2003). Vzorky ze všech třech tkání mají vysokou specifitu, ale výrazně se odlišují v senzitivitě. Vzorky odebrané ze sleziny mají senzitivitu 93 – 99 %. Vzorky z kostní dřeně pak 83 – 86 %. Nejmenší senzitivitu mají vzorky odebrané z lymfatických uzlin a to 53 – 65 % (shrnutí v Chappuis, F. et al., 2007). Méně často se využívají vzorky z jater, nebo ze složky krve obsahující leukocyty a trombocyty, vzniklé po odstředění periferní krve, takzvaný buffy coat (shrnutí v Sundar, S. & Rai, M., 2002).

U kožní leishmaniózy se tkáň odebírá z léze, nejlepší je pak odebírat tkáň z jejích okrajů. Odběr tkáně je možno provést i pomocí tenké jehly tenkojehlovou aspirací. Výsledky při použití této metody se odlišují v senzitivitě. V případě tenkojehlové aspirace dosahovala senzitivita 85 – 92 %, u tkáně odebrané běžným odříznutím byla pouze 76 – 84 %. U kožní leishmaniózy se doporučuje využívat tenkojehlové aspirace, která je pro pacienty komfortnější (Hosseinzadeh, M. et al., 2012).

Další doporučenou metodou je takzvaně Press - Imprint – Smear. Tato metoda spočívá v tom, že se pomocí biopsie odebere tkáň, která se následně nanese na podložní sklíčko a dalším sklíčkem je překryta. Poté se vyvine tlak a tkáň mezi sklíčky je zmáčknuta. V takto vzniklém preparátu jsou buňky v jedné vrstvě a leishmánie jsou tak dobře viditelné. U běžné histopatologie je více vrstev buněk a navíc je preparát ve 3D, což znamená, že jsou leishmánie hůře viditelné a navíc buňky mohou být uříznuté v místě, kde se žádné patogeny nenachází. Při

výzkumu zaměřeném na porovnání těchto dvou metod při KL u lidí byla senzitivita Press – Imprint – Smear 85,3 %, u běžné histocytologie pak pouhých 44 % (Sousa, A. Q. et al., 2014).

Hlavní výhody parazitologických metod jsou finanční nenáročnost a nízké požadavky na technické vybavení laboratoře. Díky tomu je lze využívat i v rozvojových zemích (shrnutí v Sundar, S. & Rai, M., 2002).

Nevýhody klasických parazitologických metod u lidí spočívají v tom, že jsou pro pacienty bolestivé a navíc mohou být i nebezpečné. Při odběrech kostní dřeně a vzorků ze sleziny může docházet k silnému krvácení, které výjimečně končí až smrtí pacienta. Riziko krvácení a poškození tkání však rapidně snižuje zkušený a proškolený personál, který odběr provádí (shrnutí v Sundar, S. & Rai, M., 2002).

#### 4. 2 Parazitologické metody u psů

Při viscerální leishmanióze se u psů nejčastěji odebírá tkáň z lymfatických uzlin. Je možné odebrat tkáň i z kostní dřeně, sleziny a kůže, ale tyto metody jsou pracnější a v praxi se většinou nevyužívají. Senzitivita se pohybuje okolo 50 – 60 % (shrnutí v Gharbi, M. et al., 2015).

Testy na VL u psů často vycházejí falešně negativně. Důvodem bývá velmi nízký počet leishmanií v testované tkáni. Druhým důvodem může být hemodilutovaný vzorek (shrnutí v Gomes, Y. M. et al., 2008). V případě, že je vzorek negativní, ale pes má klinické příznaky leishmaniózy, doporučuje se udělat další testy a využít jiné diagnostické techniky. U testů je důležité, aby nevykazovaly falešnou negativitu, která by vedla k rozšiřování nákazy. Také je důležité vyvarovat se falešné pozitivě, která by vedla ke zbytečné eutanázii. Pokud se u psa vyskytnou klinické příznaky, měly by být testy prováděny co nejdříve (shrnutí v Gharbi, M. et al., 2015).

## 5. Serologické metody

Serologické metody jsou založeny na reakci antigenu a protilátky v rámci specifické humorální odpovědi. Senzitivita je zde ovlivněna způsobem provedení diagnostických testů. Specifita je však ovlivňována působením antigenu (shrnuto v Elmahallawy, E. K. et al., 2014).

Serologické metody dosahují dobrých výsledků v rámci diagnostiky viscerální leishmaniózy. U pacientů s VL se velmi často objevuje hyperimmunoglobulinémie, při které dochází ke zvýšení počtu protilátek a silné imunitní reakci. Z tohoto důvodu bylo vyvinuto množství serologických metod, které jsou dnes hojně využívány při diagnostice VL u lidí i psů (Boelaert, M. et al., 2004). Většina z nich je však i dnes používána pouze ve vyspělých zemích. Mezi hlavní důvody patří vysoká cena, potřeba kvalitního laboratorního vybavení a vyškoleného personálu. Většinu serologických metod také nelze využít v terénu (shrnuto v Singh, O. P. & Sundar, S., 2015).

Hlavní nevýhoda serologických metod spočívá v tom, že je obvykle nelze účinně využívat u pacientů s kožní nebo mukokutánní leishmaniózou. U těchto pacientů je totiž nízké množství protilátek a tak je imunitní odpověď velmi slabá. Pro diagnostiku kožní a mukokutánní leishmaniózy jsou tak doporučovány metody parazitologické a molekulární (shrnuto v Singh, S. et al., 2005). Navíc jsou oblasti, kde se současně s leishmaniózou vyskytují i další parazité ze stejné taxonomické skupiny, například *Trypanosoma cruzi*, což má za následek ovlivnění specifity testů (shrnuto v Reithinger, R. & Dujardin, J. C., 2007).

### **Imunoenzymatická metoda (ELISA)**

Tato metoda je založena na detekci antigenu za použití specifické protilátky. Antigen je při této metodě imobilizován a to přímo, nebo nepřímo. Protilátka bývá konjugována například s enzymy nebo floroforem (Konstantinou, G. N., 2017).

ELISA patří mezi nejčastěji využívané serologické metody a to díky velmi vysoké senzitivitě. Hlavní nevýhoda této metody však spočívá v tom, že senzitivita zde velmi kolísá v závislosti na použitém antigenu (shrnuto v Singh, O. P. & Sundar, S., 2015).

Dnes je pro tuto metodu užíváno velké množství antigenů, jde například o antigeny získané přímo z kultury protomastigotů (Ryan, J. R. et al., 2002). Hlavní však je, že došlo k vývoji rekombinantních antigenů, z nichž nejdůležitějším je rK39. Jde o rekombinantní protein z kinesin-like genu objeveného u *L. chagasi* (shrnuto v Maia, Z. et al., 2012). Tento antigen se využívá i u imunokompetentních pacientů a pacientů se souběžným výskytem leishmaniózy a HIV (Singh, D. P. et al., 2010). Dobrých výsledků dosahují také proteiny teplotního šoku, hlavně HSP83, který začal být využíván při diagnostice KL (shrnuto v de Vries, H. J. et al., 2015).

Rozdíly v senzitivitě a specifitě při použití různých antigenů byly pozorovány v rámci mnoha výzkumů. Například při použití antigenu z kultury protomastigotů se dosahuje senzitivity mezi 80 – 100 % a specifity mezi 84 – 94 %. Při použití sekretorních, exkretorních a metabolických antigenů z protomastigotů *L. donovani* se dosahuje specifity 71 – 89 %. Při využití antigenu rK39 je pak senzitivita 75 – 98 % a specifita 79 – 89 %. Ukázalo se, že rK39 dosahuje dobrých výsledků a často tak bývá doporučován (shrnutí v Thakur, S. et al., 2020).

Hlavní nevýhoda testu založeném na rK39 spočívá ve značných rozdílech v senzitivitě mezi pacienty z Afriky a Indie. U pacientů z Afriky je senzitivita výrazně nižší. Byl tak vyvinut antigen rK28, u kterého se tyto výkyvy neobjevují (Pattabhi, S. et al., 2010). Antigen rK28 je polyprotein vytvořený z druhu *L. donovani* (shrnutí v Bhattacharyya, T. et al., 2017).

Metoda ELISA byla dále aplikována na vzorky séra od 140 psů. Skupina zahrnovala 39 symptomatických a 101 asymptomatických případů. Kromě metody ELISA probíhala analýza i molekulárními metodami. Molekulární metody pozitivně vyhodnotily 58 vzorků, tedy 41,4 %. Z těchto 58 vzorků bylo metodou ELISA jako pozitivní vyhodnoceno pouze 39, tedy 67,2 %. Ve skupině symptomatických psů byl metodou ELISA jako falešně negativní vyhodnocen pouze jeden vzorek. V skupině asymptomatických psů bylo falešně negativních 17,8 % vzorků (De Carvalho, F. L. N. et al., 2018).

### **Rychlý diagnostický test založený na rK39 (RDT – rK39)**

Tento test je založen na nitrocelulóзовých páscích s navázaným rK39 antigenem. Tyto pásky jsou vkládány do předem připravených vzorků séra. Po vložení dochází ke kapilárnímu působení. Po 10 minutách se v horní části objevuje červený kontrolní proužek indikující správnou funkci testu a pod tím se objevuje druhý červený proužek indikující pozitivitu testu (Singh, D. et al., 2013).

Mezi hlavní výhody tohoto testu spadá jeho jednoduchost, nízká cena a rychlost. Nevýhodou pak je kolísající senzitivita i specifita, která se liší v rámci různých regionů. V oblastech se souběžným výskytem např. malárie nebo enterické horečky může docházet k falešně pozitivním výsledkům (shrnutí v Singh, O. P. & Sundar, S., 2015).

Použití RDT – rK39 bylo testováno nejen na vzorcích séra, ale i na vzorcích moči. U vzorků ze séra byla senzitivita testu 100 % a specifita vyšší jak 90 %. Při testování moči byla senzitivita 96,1 % a specifita 100 % (Singh, D. et al., 2013). Další výzkum srovnával výsledky tohoto testu při použití séra a slin. Při použití séra byla senzitivita 100 % a specifita vyšší jak 94 %. Při testování slin byla výsledná senzitivita 82,5 % a specifita vyšší jak 91 % (Vaish, M. et al., 2012). Ukazuje se tak, že RDT – rK39 test je možno provést s dobrými výsledky i se vzorky odebranými zcela neinvazivně

### **Leishmaninový kožní test (LST)**

Leishmaninový kožní test bývá označován také jako Montenegro test. Tato metoda se používá pro diagnostiku takzvaně přecitlivělosti oddáleného typu. Založena je na zpožděné hypersenzitivní reakci na intradermální injekci leishmaniálních antigenů (shrnutí v Stockdale, L. & Newton, R., 2013). Tento test slouží především k analýze imunitní odpovědi po prodělané leishmanióze. Pokud tedy pacient trpí například akutní VL nebo difúzní KL, jsou výsledky tohoto testu negativní. Po vyléčení se však výsledky kožního testu změni na pozitivní. Pozitivita se objevuje i u pacientů s asymptomatickou infekcí (Khalil, E. A. et al., 2005). Tato metoda se často využívá pro mapování výskytu mukokutánní a kožní leishmaniózy u lidí i u psů. Důležitý je její význam při sledování úspěšnosti léčby u pacientů s VL. Nevýhodou pak je, že se nedá využít u pacientů trpících PKDL. Výsledky u těchto pacientů nezávisí na přítomnosti infekce (Zijlstra, E. E. et al., 2000).

V rámci leishmaninového kožního testu byl proveden výzkum, kterého se zúčastnilo 100 pacientů s KL. Každému z nich bylo do předloktí vpraveno 0,1 ml leishmaniálního antigenu. Reakce byla sledována po 48 a 72 hodinách. Pokud byl výsledek i po 72 hodinách negativní, docházelo k opakovanému testování každých 7 dní, dokud nebylo dosaženo pozitivního výsledku. Pozitivní test mělo 78 % testovaných již do dvou týdnů. Po čtyřech týdnech mělo pozitivní test 96 % pacientů a po šesti týdnech jich bylo 98 % (Manzur, A. & Bari, A. U., 2006).

### **Uvolnění interferonu gama - IGRA**

Princip této metody spočívá v detekci interferonu gama, který je produkován aktivovanými T-lymfocyty při reakci na antigen. Tímto způsobem tak lze analyzovat imunitní reakci. Metoda je snadná a rychlá (Zribi, L. et al., 2017). V rámci diagnostiky leishmaniózy bývá využívána především jako alternativa k LST. Nevýhody této metody spočívají v časové náročnosti a také v tom, že zatím není pro diagnostiku leishmaniózy plně zavedena a využívána (shrnutí v Singh, O. P. & Sundar, S., 2015).

### **Přímý aglutinační test (DAT) a rychlý aglutinační test (FAST)**

Tento test je založen na reakci anti-leishmaniálních protilátek a protomastigotů. Využívány jsou zde celé parazitické organismy. V důsledku této reakce následně dochází k aglutinaci protomastigotů (shrnutí v Elmahallawy, E. K. et al., 2014). Mezi hlavní výhody této diagnostické metody patří možnost využití v terénu, jednoduchost a relativně nízká cena (shrnutí v Mondal, S. et al., 2010). Hlavní nevýhoda pak spočívá v časové náročnosti (shrnutí v Thakur, S. et al., 2020).

Přímý aglutinační test byl porovnáván s metodou IFAT a ELISA na 61 vzorcích krve od pacientů s VL. Senzitivita DAT v tomto případě dosahovala 70,5 % a specifita 100 %.



Senzitivita u metody IFAT byla 80,3 % a specifita 90,5 %. U metody ELISA byla specifita 83,6 % a senzitivita 90,5 % (Mikaeili, F. et al., 2007). Senzitivita u metody DAT se většinou pohybuje mezi 70,5 až 100 %. Specifita pak bývá v rozmezí 53 – 100 %. DAT tedy nemá v porovnání s ostatními serologickými metodami tak vysokou senzitivitu, mívá však vyšší specifitu (shrnuje v Thakur, S. et al., 2020).

Ke snadnému a časově nenáročnému otestování u psů byl vytvořen rychlý aglutinační test FAST. Tento test je založen na metodě DAT. Rozdíl spočívá v tom, že při metodě FAST dochází pouze k jednomu zředění séra, zatímco při metodě DAT se ředí vícekrát. U rychlého aglutinačního testu je tak vyšší koncentrace parazitů v menším objemu. Zatímco vyhodnocení DAT se pohybuje mezi 12 – 18 hodinami, u FAST trvá pouhé 3 hodiny. Při výzkumu zaměřeném na porovnání DAT a FAST vyšla u FAST senzitivita 93,6 % a specifita 89,0 %. U DAT byla senzitivita 88,6 % a specifita 96,7 % (Schallig, H. D., 2002).

### **Fluorescenční test (FAT)**

Tento test je často využíván k detekci protilátek za pomoci protomastigotů. Využívá se zde fluorescenčního markeru, který se naváže na protilátku. Takto vzniklá molekula se následně naváže na cílovou molekulu. Tento proces může být přímý i nepřímý. V rámci přímého procesu se na antigen rovnou naváže označená protilátka. V rámci nepřímého procesu se na antigen naváže sekundární polyklonální protilátka. Vyhodnocení probíhá pomocí fluorescenčního mikroskopu (Boelaert, M. et al., 2004).

Metody založené na nepřímém fluorescenčním testu jsou u psů nejdůležitější serologickou diagnostickou metodou. Specifita i senzitivita se u nich většinou pohybuje okolo 100 %. Výjimku tvoří areály, kde dochází k překrývání s *Trypanosoma cruzi*. V těchto oblastech jsou časté falešně pozitivní testy (shrnuje v Paltrinieri, S. et al., 2016).

### **Latexový aglutinační test (LAT)**

Tento test patří mezi nejnovější serologické metody. Někdy bývá označován také jako KAtex. Je založen na detekci reakce anti-leishmaniálních protilátek na antigeny získané z protomastigotů, nebo na A2 antigeny z amastigotů získávaných z *L. donovani* (Akhoundi, B. et al., 2013). Při této metodě jsou využívány latexové částice, na jejichž povrch jsou navázány antigeny. Při pozitivní reakci dojde ke srážení těchto částic (shrnuje v Wanger, A. et al., 2017). Hojně se využívá pro diagnostiku vzorků moči. Hlavními výhodami tohoto testu jsou jeho rychlost a jednoduchost. Hlavní nevýhodou je pak velmi variabilní senzitivita, které může být i velmi nízká. Pohybovat se může v rozmezí 39,8 – 100 %. Specifita bývá uváděna v rozmezí 64 – 100 % (Fararouei, M. et al., 2018).

Latexový aglutinační test provedený na vzorcích moči dosahoval senzitivity mezi 68 – 100 %. Specifita pak byla 100 %. Metoda tak dosahovala dobrých výsledků i u vzorků odebraných zcela neinvazivně (Attar, Z. J. et al., 2001).

Latexový aglutinační test byl dále testován na vzorcích séra od souboru tvořeného 43 pacienty s VL, 32 pacienty s jinou infekcí než VL a 30 zdravými lidmi, kteří zde figurovali jako kontrolní skupina. Výsledná senzitivita zde vyšla 88,4 % a specifita 93,5 %. Vzorky byly testovány i pomocí DAT, přičemž u přímého aglutinačního testu trvalo vyhodnocení 12 – 18 hodin. Analýza pomocí LAT trvala pouhých 3 – 5 minut (Akhoundi, B. et al., 2013).

Další výzkum otestoval metodu LAT při použití rekombinantního antigenu A2. U symptomatických psů byla senzitivita 27,3 % a specifita 94,6 %. U asymptomatických psů byla senzitivita pouhých 5 % a specifita 74,29 % (Farahmand, M. et al., 2018).

### **Imunochromatografický test (ICT)**

Při tomto testu jsou využívány dva druhy specifických protilátek. Jedna z nich je imobilizována na chromatografickém papíru a druhá se nachází na vzorkové podložce a je označena pomocí koloidního zlata. Poté, co se vzorek přenesení na podložku, vznikne komplex z jeho antigenu a označené protilátky. Tento komplex dále přichází do kontaktu s imobilizovanou protilátkou. Následně dochází ke vzniku červenofialové čáry, která indikuje přítomnost sledovaného antigenu (TAUNS, 2007).

Pro použití v terénu byl vyvinut rychlý imunochromatografický test založený na rK39 antigenu. Tento test tvoří speciální proužek potažený rK39, na kterém se nachází oblast s konjugovaným barvivem. Část tohoto proužku se vloží do séra a dojde ke kapilárnímu působení. Následně zreaguje sérum, barvivo a antigen, což indikuje přítomnost anti-rK39 imunoglobulinů (Welch, R. J. et al., 2008).

Mezi hlavní výhody patří nízká cena, rychlost a možnost využití i v terénu (shrnutí v Elmahallawy, E. K. et al., 2014). Jeho nevýhody však spočívají v relativně velkých výkyvech senzitivity a specifity. Poklesy jsou značné u pacientů s HIV ko-infekcí (Bangert, M. et al., 2018).

Imunochromatografický test byl prováděn dohromady na 405 pacientech s VL. Tato skupina zahrnovala pacienty HIV pozitivní i negativní. Celková senzitivita činila 78,0 %. Dále došlo k otestování pouze HIV pozitivních jedinců. Zde byla senzitivita 67,3 %. Ve skupině složené z HIV negativních byla senzitivita nejvyšší, dosahovala 83,1 % (Bangert, M. et al., 2018).

Při porovnání rychlého imunochromatografického testu rK39 s metodou IFAT na 68 vzorcích od psů, vyšla senzitivita rK39 ICT 97 % (66 vzorků). U IFAT byla senzitivita 99 % (67 vzorků). U obou testů byla shodná specifita 100 % (Otranto, D. et al., 2004).

### **Immunoblotting**

V rámci této metody se využívají koloidní (rozpustné) antigeny ke zkoumání imunitní odpovědi. Využívá se zde techniky western blot (Ravindran, R. et al., 2004). Tato metoda má velmi vysokou senzitivitu i specifitu a může být použita pro diagnostiku VL i KL. Přesto se však v praxi příliš nevyužívá. Důvodem jsou vysoké náklady, potřeba kvalitního laboratorního zázemí i časová náročnost (shrnutí v Elmahallawy, E. K. et al., 2014).

Při využití této metody na 61 pacientech s KL byla výsledná senzitivita více než 95 % a specifita více než 70 %. Tímto bylo potvrzeno, že přestože tato metoda spadá mezi serologické, dosahuje velmi dobrých výsledků i v diagnostice KL (Ashrafmansouri, M. et al, 2015).

## 6. Molekulární metody

Molekulární metody spočívají v detekci parazitické DNA ve tkáních (shrnuto v Sundar, S. & Rai, M., 2002). Jejich použití je tedy možné i u pacientů bez detekovatelných protilátek (Pereira, M. R. et al., 2014). Většina druhů leishmání již byla osekvenována a tím byl umožněn rychlý rozvoj nových způsobů diagnostiky. Vznikly tak metody umožňující snadnou detekci, identifikaci, kvantifikaci a fylogenetickou analýzu (shrnuto v Sundar, S. & Singh, O. P., 2018).

Molekulární metody jsou v diagnostice leishmaniózy používány stále častěji. Nejprve byly brány spíše jako doplněk parazitologických a serologických metod, nyní však bývají v některých případech doporučovány jako primární způsob diagnostiky. Jsou považovány za spolehlivé, bezpečné a snadno proveditelné v laboratořích po celém světě (shrnuto v Thakur, S. et al., 2020). Jejich největší nevýhody spočívají v časové náročnosti, vysokých nákladech a obvykle také v nárocích na laboratorní zázemí a vyškolený personál (de Paiva-Cavalcanti, M. et al., 2015).

Pro molekulární diagnostiku leishmaniózy se nejčastěji využívají metody založené na polymerázové řetězové reakci. U PCR metod je možno využívat vzorky z různých typů tkání. Tkáň, ze které testovaný vzorek pochází, má vliv na senzitivitu i specifitu (shrnuto v Sundar, S. & Singh, O. P., 2018). Tento typ metod bývá většinou vyhodnocován na gelu pomocí elektroforézy (Graça, G. C. et al., 2012).

### **Konvenční PCR (cPCR)**

V rámci PCR reakcí dochází k nasyntetizování velkého množství kopií vybrané sekvence DNA, nebo RNA. Amplifikace probíhá v opakujících se cyklech *in vitro*. Většina v současnosti používaných PCR metod míří na geny malých ribozomálních podjednotek nebo minikroužky kinetoplastu, čímž se zvyšuje senzitivita testů (shrnuto v Paltrinieri, S. et al., 2016).

Konvenční PCR je metoda velmi dobře využitelná i pro vzorky s nižší parazitémií, kde ostatní metody, především ty klasické, často selhávají. Díky tomu se cPCR využívá také pro sledování vývoje nemoci a účinků léčby a pro zkoumání rezistence k léčivům (shrnuto v Schönian, G. et al., 2011). Mezi hlavní výhody této metody patří vysoká senzitivita v porovnání s parazitologickými metodami. Nevýhody pak spočívají ve vysokém riziku kontaminace (Sudarshan, M. & Sundar, S., 2014).

Konvenční PCR se u lidí používá stále častěji jak v diagnostice VL, tak i KL. V porovnání s ostatními diagnostickými metodami poskytuje jedny z nejlepších výsledků. Ve výzkumu, kterého se účastnilo 30 pacientů s podezřením na VL, byl od každého pacienta odebrán právě jeden vzorek. Tyto vzorky byly následně analyzovány metodami cPCR, IFAT a qPCR. Z 30 vzorků bylo 19 identifikováno jako pozitivní. Z těchto 19 vzorků bylo 63 % (12/19) potvrzeno pomocí IFAT a 79 % (15/19) bylo potvrzeno pomocí cPCR i qPCR. Při porovnávání

cPCR, IFAT a qPCR se tak ukázalo, že cPCR a qPCR jsou stejně efektivní a zároveň jsou obě tyto metody efektivnější než IFAT (Pereira, M. R. et al., 2014).

Metoda cPCR byla dále porovnávána s klasickými mikroskopickými metodami a tvorbou in-vitro kultur. Výzkum probíhal na 62 vzorcích od pacientů s podezřením na KL, přičemž 35 bylo pozitivních. U cPCR byla senzitivita 100 % (35/35), u mikroskopie byla senzitivita 71,4 % (25/35) a u kultury vyšla pouze 54,3 % (19/35). Mikroskopie a kultura pak dohromady potvrdila 31 z 35 vzorků a celková senzitivita dosahovala 88,6 %. Výzkum tak potvrdil, že metody založené na cPCR dosahují lepších výsledků než nejčastěji využívané parazitologické metody (Zeyrek, F. Y. et al., 2018).

Další výzkumy prováděné na pacientech s VL za využití cPCR ukázaly, jak se liší specifita a senzitivita v závislosti na testované tkáni. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u vzorků z kostní dřevě, kde se senzitivita pohybovala okolo 95,3 – 97 % a specifita byla 92,6 – 100 %. Nejhorších výsledků naopak dosahovaly vzorky pocházející z bukálních stěrů, kde se senzitivita pohybovala mezi 79 – 83 % a specifita mezi 86 – 90,56 % (shrnutí v Sundar, S. & Singh, O. P., 2018).

V rámci odběru vzorků u pacientů s podezřením na KL je možno využít i nový a zcela neinvazivní způsob. Ten spočívá v použití speciální pásky, která se na 20 sekund přitlačí na kůži v oblasti aktivních nebo zahojených lézí. Po uplynutí této doby je páska vložena do sterilní nádoby a skladována při 4 stupních Celsia až do doby, než dojde k jejímu analyzování. Z pásky je pak možno izolovat parazitickou DNA. Ta se následně extrahuje a analyzuje pomocí cPCR. Metoda byla vyzkoušena na 31 pacientech s podezřením na KL. Senzitivita i specifita byla 100 % (Taslimi, Y. et al., 2017).

### **Kvantitativní PCR (qPCR)**

Odlišnost této metody od klasického PCR spočívá ve vzniku a následné analýze fluorescenčních signálů při amplifikaci. Fluorescenci lze vyvolat pomocí fluorescenčního barviva nebo fluorescenčních sond. Výhoda fluorescenčních barviv oproti sondě spočívá v nižší ceně. Nevýhodou pak je častější falešná negativita než při použití sondy (shrnutí v Galluzzi, L. et al., 2018).

Kvantitativní PCR je v posledních letech využívána stále častěji. Mezi její hlavní výhody patří nízká pravděpodobnost kontaminace, možnost určení konkrétního druhu leishmanií, vysoká rychlost a přesnost. Hlavními nevýhodami jsou vysoká cena a potřeba zkušeného a kvalifikovaného personálu. Kvůli tomu je metoda zatím využívána především tam, kde běžná diagnostika selhává, například u pacientů s PKDL nebo relapsy (shrnutí v Thakur, S. et al., 2020).

Při porovnávání účinnosti qPCR a mikroskopie u 91 pacientů s PKDL, byla senzitivita qPCR 91,2 %. U mikroskopie pak dosahovala pouhých 50,6 % (Ghosh, P. et al., 2018).

Nejvyšší senzitivitu u qPCR mívají vzorky z buffy coat, kde se dosahuje 100 % a specifita je pak 90 %. Vzorky z plné krve mají senzitivitu 90 – 100 % a specifitu 83,3 – 100 %. Senzitivita u vzorků ze slin dosahuje 95 % a specifita je 90 – 100 % (shrnutí v Sundar, S. & Singh, O. P., 2018).

Vzorky se dají nově odebírat pomocí mikrobiopsie. Při mikrobiopsii dochází k pronikání do kůže v maximální hloubce 200 mikrometrů a metoda je tak minimálně invazivní. Díky této vlastnosti je její použití možné i u asymptomatických infekcí, kde jsou běžné invazivní metody považovány za neetické. Mikrobiopsií je možno odebrat krev i lyzáty kožních buněk. Odebrané vzorky je pak možno dále analyzovat například pomocí qPCR (Kirstein, O. D. et al., 2017).

U psů proběhla studie zaměřená na porovnání cPCR a qPCR. Testy byly dělány na vzorcích séra, přičemž 37 vzorků bylo od psů symptomatických a 112 od psů asymptomatických. Senzitivita cPCR u symptomatických psů byla 67,6 % (25/37) a 70,5 % (79/112) u asymptomatických. Kvantitativní PCR provedené na symptomatických psech mělo senzitivitu 97,3 % (36/37). U asymptomatických psů bylo potvrzeno 111 vzorků ze 112, senzitivita tedy byla 99,1 % (Mohammadiha, A. et al., 2013).

U psů se doporučuje molekulární analýza vzorků pocházejících z kostní dřevě a lymfatických uzlin. Momentálně nejdoporučovanější diagnostickou metodou u psů je qPCR. Důvodem je vysoká specifita i senzitivita, ale také nízká cena, která je zde nutná. Většina ostatních molekulárních metod je u psů sice také použitelná, ale kvůli vysokým nákladům a potřebě vyškoleného personálu se běžně neprovádí (shrnutí v Travi, B. L. et al., 2018).

### **Nested a semi-nested PCR**

Nested a semi-nested PCR je modifikací na cPCR a jde o jednu z nejvíce senzitivních metod využívající polymerázové řetězové reakce. Skládá se ze dvou samostatných PCR reakcí, při kterých jsou využívány dva různé primery. Cílem druhého cyklu je znásobení produktů z prvního cyklu a zároveň případné zředění inhibitorů (Deepachandi, B. et al., 2019).

Hlavní výhoda této metody tedy spočívá v senzitivě, ale také v možnosti určit konkrétní druh leishmáníí. Metoda je také relativně rychlá a snadná na provedení (Akhavan, A. A. et al., 2010).

Největší nevýhoda této metody spočívá v riziku kontaminace, ke které může dojít při přípravě na druhou amplifikaci. V této chvíli dochází k otevření reakčních zkumavek. Výsledkem kontaminace je falešná pozitivita. Z tohoto důvodu byla vyvinuta metoda, při níž může celý děj probíhat pouze v jedné zkumavce. Primery jsou při ní imobilizovány na vnitřním víčku reakční zkumavky a uvolněny až před druhou reakcí. Metoda je stejně účinná jako běžné nested PCR (Da Silva, M. A. L. et al., 2013).

Nested PCR a cPCR byly porovnávány na pacientech s PKDL. Z celkem 29 vzorků bylo pomocí nested PCR rozpoznáno 27, úspěšnost tedy byla 93 %. Oproti tomu cPCR jako pozitivní vyhodnotilo pouze 20 vzorků z 29, úspěšnost zde byla 69 % (Sreenivas, G., 2004).

Nested PCR probíhající pouze v jedné zkumavce bylo testováno na 40 pacientech infikovaných *L. donovani* a porovnáváno s běžnou mikroskopií a in-vitro kulturou. U nested PCR byla senzitivita i specifita 100 %. Mikroskopie potvrdila pozitivitu u 30 vzorků s úspěšností 75 %. Nejnižší úspěšnost byla u in-vitro kultury, kde bylo potvrzeno 29 vzorků s úspěšností 72,5 % (Deepachandi, B. et al., 2019).

Nested PCR bylo dále porovnáváno i s mikroskopií a IFAT v rámci longitudinální studie na 43 psech. Ukázalo se, že nested PCR dosahovalo nejvyšší senzitivity, která činila 100 %. U parazitologie byla 51,2 % a u IFAT 48,5 % (Oliva, G. et al., 2006).

### **Multiplexová PCR**

Multiplexová PCR je výhodná kvůli tomu, že dokáže kombinovat různé metody založené na polymerázové řetězové reakci a dochází při ní k amplifikaci různých částí DNA. Využívají se zde kombinace několika primerů v jedné směsi a reakce probíhá za střídání teplot. To vše v rámci jednoho testu. Mezi nevýhody patří výkyvy v senzitivitě, cena, potřeba dobrého laboratorní vybavení a také nutnost rozsáhlé optimalizace testu. Kvůli těmto nevýhodám se multiplexová PCR využívá v diagnostice leishmaniózy spíše výjimečně. Nejčastěji je využívána k detekci a určení konkrétního druhu leishmáníí uvnitř flebotoma (shrnuto v Thakur, S. et al., 2020).

### **PCR – ELISA**

Tato metoda se vyskytuje na pomezí serologicko-molekulárních metod. PCR – ELISA má tři kroky a to amplifikaci, imobilizaci a detekci. V prvním kroku dochází k amplifikaci požadovaného genu pomocí PCR. Produkty PCR se pak vážou na oligonukleotidové sondy. Následně dochází k imobilizaci na mikrodestičce a detekci nukleových kyselin. Pro detekci může být využita anti-DIG-peroxidáza konjugovaná přes 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonát. Výsledkem je modrozelené zbarvení detekovatelné spektrometrem. Využita může být ale i fluorescence. Antifluorescenční protilátky pak detekují oligonukleotidové sondy značené fluoresceinem (shrnuto v Sue, M. J. et al., 2014).

Mezi hlavní výhody patří možnost otestovat více vzorků a to za kratší čas než při cPCR. V porovnání s cPCR může dosahovat vyšší senzitivity a navíc jsou zde nižší detekční limity. Tato metoda je považována za bezpečnou, spolehlivou a velmi slibnou na poli diagnostiky (Medeiros, F. A. C. et al., 2017).

PCR – ELISA byla rozsáhle testována na souboru skládajícím se ze 105 pacientů s VL, 25 pacientů s HIV ko-infekcí, 40 zdravých jedinců a 33 pacientů s asymptomatickou infekcí.

Celková senzitivita pro všechny skupiny byla 100 % a specifita 95 % (Medeiros, F. A. C. et al., 2017). Dále byla tato metoda otestována na krevních vzorcích skupiny 56 lidí s VL. Všichni pacienti byli HIV-negativní a tím pádem měli i menší parazitémii. Výsledná senzitivita zde činila 83,9 % a specifita 100 %. Vzorky byly testovány i metodou cPCR, kde byla senzitivita nižší a dosahovala 73,2 %. Specifita u cPCR byla 87,2 % (De Doncker, S. et al., 2005).

### **PCR s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR – HRM)**

Jde o jednu z novějších molekulárních technik. Její princip spočívá v měření změn intenzity fluorescence interkalačního barviva při rozštěpení dvouřetězcové DNA na jednořetězcovou. Využívá se pro přímou charakterizaci DNA amplikonů (Mohammadi, M. A. et al., 2017).

Mezi její výhody patří schopnost identifikace různých druhů leishmání a vysoká senzitivita. Dále pro její aplikaci stačí malé množství DNA, dá se využít i u vzorků s nízkou parazitémií a je možné díky ní analyzovat velké množství vzorků za krátký časový úsek (Asfaram, S. et al., 2020). Hlavní nevýhoda spočívá v drahém vybavení laboratoře, bez kterého tuto metodu nelze využívat (Mohammadi, M. A. et al., 2017).

PCR – HRM bylo testováno na 105 vzorcích odebraných z kožních lézí u pacientů s předpokladem KL. Vzorky byly kromě PCR - HRM analyzovány i cPCR a mikroskopií. Specifita byla u všech třech metod stejná a to 100 %. V senzitivitě však byly výrazné rozdíly. PCR – HRM mělo senzitivitu 89 % (94/105), cPCR dosahovalo 85 % (90/105). Mikroskopie měla nejnižší senzitivitu, potvrdila 60 vzorků ze 105 a senzitivita tedy byla pouze 57 % (Asfaram, S. et al. 2020).

### **PCR s polymorfismem délky restrikčních fragmentů (PCR – RFLP)**

RFLP metoda je založena na tom, že po rozštěpení DNA restrikčními enzymy vzniknou DNA fragmenty s různou délkou, které mohou být vizualizovány gelovou elektroforézou (Marfurt, J. et al., 2003). Pro tuto metodu je nutné použití velkého množství DNA, proto se obvykle používá v kombinaci s PCR amplifikací. Tato metoda následně umožňuje rozeznání jednotlivých druhů leishmání na základě analýzy jednotlivých fragmentů (Quaresma, P. F. et al., 2009). Výhodou této metody je také její vysoká specifita a relativně nízká cena (Kato, H. et al., 2019).

PCR – RFLP bylo využito k testování 94 vzorků od pacientů s podezřením na KL, kde mělo nejenom potvrdit pozitivitu, ale i určit konkrétní druh leishmání. Vzorky byly odebrány z obličeje, rukou a nohou. Všechny vzorky byly potvrzeny jako pozitivní a zároveň u všech došlo k určení konkrétního druhu. Pomocí metody PCR – RFLP bylo určeno, že 33 vzorků obsahuje druh *L. major* a zbývajících 61 druh *L. tropica* (Mohammadiha, A. et al., 2017).

Metoda PCR – RFLP byla otestována i u psů. Analyzovány byly vzorky z kůže, krve a kostní dřeně od 217 psů. Ukázalo se, že vzorky z kůže, lymfatických uzlin a kostní dřeně jsou vhodnější než vzorky z periferní krve. V periferní krvi se totiž nachází menší množství kopií



leishmaniální kDNA. PCR - RFPL dokázalo úspěšně určit konkrétní druh u 194 zvířat (Quaresma, P. F. et al., 2009).

### **Izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP)**

LAMP test patří mezi diagnostické metody založené na izotermální amplifikaci parazitické DNA. Ta je zprostředkována smyčkou. LAMP test není cyklický a neprobíhá při něm střídání teplot. Teplota se udržuje mezi 60 – 65 stupni Celsia. Tato metoda se dnes využívá k detekci leishmání u lidí i psů (de Avelar, D. M. et al., 2019). Možné je i její využití u pacientů v PKDL (Verma, S. et al., 2013).

Mezi hlavní výhody této metody patří vysoká senzitivita a specifita. Dále je tato metoda relativně levná, nevyžaduje použití termocykleru a její provedení je snadné. To vše umožňuje její použití i v rozvojových zemích, časté je využití této metody v terénu (shrnutí v Nzelu, C. O. et al., 2019). Mezi hlavní nevýhody patří zvýšené riziko kontaminace. Produkty LAMP reakce se vyznačují vysokou stabilitou a jsou špatně degradovatelné. Může se stát, že omylem dojde k jejich přenosu a následné kontaminaci, která vede k falešně pozitivním výsledkům (shrnutí v Wong, Y. P. et al., 2018).

Účinnost LAMP testu byla zkoumána na pacientech trpících VL a PKDL. U pacientů s VL bylo otestováno 55 vzorků z krve a senzitivita zde dosahovala 96,4 % (53 vzorků). Od pacientů s VL bylo dále testováno 15 vzorků z kostní dřeně, specifita zde byla 100 %. V posledním případě pak byly testovány vzorky odebrané při biopsii od pacientů s PKDL. Vzorků bylo celkem 62, potvrzeno bylo 60, výsledná senzitivita tak činila 96,8 % (Verma, S. et al., 2013). Dále byl LAMP test proveden i na 105 pacientech s KL. Senzitivita v tomto případě byla 95 % a specifita 86 % (Adams, E. R. et al., 2018).

LAMP test by použit i na vzorky pocházející od 75 psů s podezřením na *L. infantum*. Šlo o vzorky z krve a kromě LAMP testu probíhala jejich analýza taktéž přes cPCR, IFAT a mikroskopii. Nejvyšší senzitivitu měla metoda IFAT a to 88,57 %, ale specifita byla pouhých 52,5 %. U cPCR vyšla senzitivita pouze 37,14 %, specifita však byla 82,5 %. LAMP mělo senzitivitu 54 % a specifitu 80 %. Dá se tedy říct, že nejlépe dopadl LAMP test, kde sice ani jedna hodnota nebyla příliš vysoká, ale zároveň ani příliš nízká (Chaouch, M. et al., 2013).

LAMP test je u psů také možné snadno provádět ze stěrů spojivky. Jedná se tedy o metodu neinvazivní. Stěr ze spojivky se provádí pomocí bavlněného tamponu, tím se exfoliují epiteliální buňky ze spojivky pravého i levého oka. Použitá část tamponu se odstříhne a přeneše do sterilního solného roztoku. Takto připravený vzorek se skladuje na ledu při teplotě -20 stupňů Celsia. Následně se z něj extrahuje DNA 15 minutovým převařením v 0,9 % NaCl a 15 minutovou centrifugací o hodnotě 10 000 g a při teplotě 4 stupňů Celsia. Výzkum, který porovnával výsledky LAMP testu ze stěru spojivky, cPCR, ELISA a mikroskopie prokázal

senzitivita u LAMP testu 61,3 %, u cPCR 58,6 %, u ELISA 40,5 % a u mikroskopie 10,8 %. Specifita u obou molekulárních metod byla 97 % (Gao, C. et al., 2015).

Stěry je možné provádět i z čenichu nebo tlamy a dále je vyhodnocovat například pomocí qPCR. U stěrů bývají výsledky v rámci jedné metody velmi podobné. Další výzkum porovnával senzitivitu u stěru ze spojivky a stěru z tlamy. Analýza proběhla pomocí qPCR. Senzitivita u stěru z tlamy byla 67,4 % a u stěru ze spojivky 68,5 % (Aschar, M. et al., 2016).

### **Amplifikace založená na sekvenci nukleových kyselin (NASBA)**

Jde o metodu, při které dochází k amplifikaci cílové sekvence nukleové kyseliny při izotermální reakci. Výchozí nukleovou kyselinou je zde RNA. NASBA má mnoho modifikací, v diagnostice leishmaniózy je často využívána NASBA – oligochromatografie (Saad, A. A. et al., 2010). V některých případech je využíván také kvantitativní – NASBA test (van der Meide, W. F. et al., 2005). Mezi hlavní výhody této metody patří vysoká senzitivita i specifita, hlavní nevýhodou je pak možnost kontaminace ribonukleázou (shrnutí v Zanolí, L. & Spoto, G., 2012).

Oligochromatografie je založena na *Leishmania* OligoC-TesTu a NASBA – oligochromatografii (Mugasa, C. M. et al., 2010). OligoC TesT spočívá v amplifikaci sekvence 18S rRNA genu a následné vizualizaci produktů na dipstiku hybridizací sondy konjugované se zlatem. Pro detekci produktů je potřeba pouze pipeta a topný blok (Espinosa, D. et al., 2009).

Jde tedy o relativně snadnou a rychlou metodu, umožňující sekvenčně specifickou detekci produktů PCR nebo NASBA (Deborggraeve, S. et al., 2008). Výhody této metody spočívají v tom, že nevyžaduje žádné speciální laboratorní vybavení, poskytuje vysokou senzitivitu, je levná a rychlá. Provedení testu trvá pouhých 5 až 10 minut (Laurent, T. et al., 2009). Nevýhodou je, že tato metoda nedokáže rozlišit jednotlivé druhy leishmanií a navíc je pro její provedení nutné alespoň základní vybavení laboratoře pro molekulární diagnostiku. Nelze ji tak i přes její jednoduchost použít v primárních diagnostických centrech (Saad, A. A. et al., 2010).

NASBA – OC (oligochromatografie) byla použita na otestování 84 vzorků od pacientů s VL. Při tomto testu bylo dosaženo senzitivity 79,8 % a 100% specifity (Basiye, F. L. et al., 2010).

### **Náhodně amplifikovaná polymorfni DNA (RAPD)**

Tato metoda spočívá v amplifikaci náhodně polymorfni DNA. Amplifikace probíhá pomocí PCR a to za použití jednoho krátkého primeru. Pro tuto techniku není nutné znát cílové sekvence DNA. Primer je libovolně definován, což umožňuje užití této metody u jakéhokoli organismu (Toledo, A. et al., 2002). Vyhodnocení probíhá gelovou elektroforézou, přičemž výsledek je následně porován s referenčním profilem daného druhu leishmanie (Saadabadi, F. et

al., 2013). RAPD bývá využíváno jak samostatně, tak i v kombinaci s dalšími metodami. Často je využíváno ke zkoumání genetické diverzity leishmanií (Zemanová, E., et al., 2004). Mezi hlavní nevýhody patří potřeba čisté DNA a správné a přesné provedení PCR, jinak dochází k výkyvům ve specifitě (shrnutí v Akhouni, M. et al., 2017).

#### **Polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů (AFLP)**

Tato metoda je založena na selektivní amplifikaci restričních fragmentů a umožňuje analýzu polymorfismu. Restriční fragmenty jsou získávány rozštěpením DNA za účasti restriktáz EcoRI a MseI. Amplifikace zde probíhá pomocí PCR. Amplifikované fragmenty jsou odděleny a vizualizovány na polyakrylamidovém gelu a následně analyzovány. Hlavní výhodou této metody spočívá v tom, že není nutné znát u daného organismu cílové sekvence, aby mohlo dojít k rychlé vizualizaci polymorfní DNA. Tato technika se často využívá k identifikaci blízké příbuzných druhů leishmanií. Její další využití spočívá i ve zkoumání genetické variability v kmenech (Kumar, A. et al., 2010).

#### **Multilokusová enzymová elektroforéza (MLEE)**

Tato metoda využívá elektroforetickou mobilitu intracelulárních izoenzymů k identifikaci jednotlivých druhů leishmanií (Ovalle-Bracho, C. et al., 2018). Zkoumané izoenzymy se nacházejí v různých buněčných kompartmentech, kde se podílejí na metabolických procesech a jsou kódovány různými geny. Druhy jsou rozpoznávány na základě rozdílnosti v těchto izoenzimech (Jamjoom, M. B. et al., 2004). Nevýhodou však je, že tato metoda vyžaduje specializované a drahé vybavení (Schönian, G. et al., 2010). Je tak momentálně prováděna pouze v devíti referenčních centrech světa (Ovalle-Bracho, C. et al., 2018).

## 7. Závěr

V práci jsem se zaměřila na popsání a porovnání parazitologických, serologických a molekulárních metod. Věnovala jsem se především metodám serologickým a molekulárním, protože v této oblasti došlo v posledních letech ke značným pokrokům.

Ačkoli jsou stále nejčastěji využívány metody parazitologické, použití serologických a molekulárních metod je obvykle vhodnější. U většiny nových metod totiž odpadá nutnost silně invazivních zákroků, jako jsou například punkce z jater či sleziny využívané pro běžnou histocytologii. Nové metody jsou minimálně invazivní a pro pacienty bezpečné a komfortní. V posledních letech se dokonce objevilo několik metod, při kterých není nutný žádný zásah do těla pacienta.

Většina nových metod je sice v porovnání s běžnými technikami finančně náročnější, kompenzují to však vyšší senzitivitou a specifitou (Tabulka č. 1). Některé nové metody je také možné použít nejen k rozpoznání infekce, ale také k určení konkrétního druhu leishmání, mapování jejich genetické diverzity či ke studiu rozšiřování onemocnění.

Ze serologických metod se jako velmi slibný ukázal například latexový aglutinační test, který je možno s dobrými výsledky provádět i na vzorcích moči bez jakéhokoli invazivního zásahu. Test navíc zabere pouhých 3 až 5 minut. V rámci diagnostiky psů je pak nadějný rychlý aglutinační test (FAST), který zkombinoval výhody přímého aglutinačního testu s nízkou časovou náročností.

Na poli molekulárních metod pak velmi dobrých výsledků dosahuje například LAMP test, který může nabídnout vysokou senzitivitu, relativně vysokou specifitu, nízkou cenu i časovou nenáročnost. Podobných výsledků pak dosahuje například i NASBA.

Serologické a molekulární metody ukázaly, že v diagnostice leishmaniózy mají co nabídnout. Některé z nich je díky jejich ceně a nenáročnosti možné snadno využít i v rozvojových státech. Zřejmě tak začnou být v blízké budoucnosti daleko více využívány.

Tabulka č. 1 – Přehled výhod a nevýhod jednotlivých diagnostických metod. Vlastní tvorba.

<b>metoda</b>	<b>senzitivita</b>	<b>specifita</b>	<b>cena</b>	<b>časová náročnost</b>	<b>náročnost provedení</b>
ELISA	kolísavá (střední až vysoká)	střední	střední	střední	střední
RDT – rK39	kolísavá (střední až vysoká)	kolísavá (střední až vysoká)	nízká	nízká	nízká
LST	vysoká	vysoká	střední	vysoká	střední
IGRA	střední	střední	střední	vysoká	střední
DAT	střední	střední	nízká	vysoká	nízká
FAST	střední	střední	nízká	nízká	nízká
FAT	vysoká	střední	střední	střední	střední
LAT	variabilní (střední až nízká)	střední	střední	nízká	střední
ICT	kolísavá (střední až vysoká)	kolísavá (střední až vysoká)	nízká až střední	nízká	nízká
Immunoblotting	vysoká	vysoká	vysoká	vysoká	vysoká
cPCR	vysoká	střední	střední	střední	střední až vysoká
qPCR	vysoká	vysoká	vysoká	nízká až střední	vysoká
nested PCR	vysoká	střední	střední	nízká až střední	střední
multiplex PCR	kolísavá (střední až vysoká)	kolísavá (střední až vysoká)	vysoká	střední až vysoká	vysoká
PCR - ELISA	vysoká	vysoká	střední	střední	vysoká
PCR - HRM	vysoká	kolísavá (střední až vysoká)	vysoká	nízká	vysoká

<b>metoda</b>	<b>senzitivita</b>	<b>specifita</b>	<b>cena</b>	<b>časová náročnost</b>	<b>náročnost provedení</b>
PCR - RFLP	střední	kolísavá (střední až vysoká)	nízká až střední	střední	vysoká
LAMP	vysoká	kolísavá (střední až vysoká)	nízká	nízká až střední	nízká
NASBA	vysoká	kolísavá (střední až vysoká)	nízká až střední	nízká až střední	nízká až střední
RAPD	kolísavá (střední až vysoká)	kolísavá (střední až vysoká)	střední	střední	vysoká
AFLP	střední	vysoká	střední	střední	střední
MLEE	vysoká	vysoká	vysoká	vysoká	vysoká

## Seznam literatury

- Adams, E. R., Schoone, G., Versteeg, I., Gomez, M. A., Diro, E., Mori, Y., Perlee, D., Downing, T., Saravia, N., Assaye, A., Hailu, A., Albertini, A., Ndung'u, J. M., & Schallig, H. (2018). Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology*, 56(7), e00386-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00386-18>
- Akhavan, A. A., Mirhendi, H., Khamesipour, A., Alimohammadian, M. H., Rassi, Y., Bates, P., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G., Arandian, M. H., Abdoli, H., Jalali-zand, N., Jafari, R., Shareghi, N., Ghanei, M., & Yaghoobi-Ershadi, M. R. (2010). Leishmania species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Experimental parasitology*, 126(4), 552–556. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.003>
- Akhoundi, B., Mohebali, M., Shojaee, S., Jalali, M., Kazemi, B., Bandehpour, M., Keshavarz, H., Edrissian, G. H., Eslami, M. B., Malekafzali, H., & Kouchaki, A. (2013). Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Experimental parasitology*, 133(3), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.002>
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., ... Sereno, D. (2017). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 57, pp. 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- Alten, B., Maia, C., Afonso, M. O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., Molina, R., Bañuls, A. L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Khoury, C., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., ... Gradoni, L. (2016). Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(2), e0004458. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004458>
- Asfaram, S., Fakhar, M., Mirani, N., Derakhshani-niya, M., Valadan, R., Ziaei Hezarjaribi, H., & Emadi, S. N. (2020). HRM-PCR is an accurate and sensitive technique for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis as compared with conventional PCR. *Acta Parasitologica*, 65(2), 310–316. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00154-5>
- Ashrafmansouri, M., Sarkari, B., Hatam, G., Habibi, P., & Abdolahi Khabisi, S. (2015). Utility of Western Blot Analysis for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Iranian journal of parasitology*, 10(4), 599–604.

- Aschar, M., de Oliveira, E. T. B., Laurenti, M. D., Marcondes, M., Tolezano, J. E., Hiramoto, R. M., ... da Matta, V. L. R. (2016). Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 225, 108–113. doi:10.1016/j.vetpar.2016.06.005
- Attar, Z. J., Chance, M. L., el-Safi, S., Carney, J., Azazy, A., El-Hadi, M., Dourado, C., & Hommel, M. (2001). Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta tropica*, 78(1), 11–16. https://doi.org/10.1016/s0001-706x(00)00155-8
- Ayele, A., & Seyoum, Z. (2016). A Review on Canine Leishmaniasis ; Etiology , Clinical Sign, Pathogenesis , Treatment and Control Methods. *Global Veterinaria*, 17(4), 343–352. https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2016.17.04.104151
- Baneth, G., Yasur-Landau, D., Gilad, M., & Nachum-Biala, Y. (2017). Canine leishmaniosis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: comparative findings and serology. *Parasites & vectors*, 10(1), 113. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2050-7
- Bangert, M., Flores-Chávez, M. D., Llanes-Acevedo, I. P., Arcones, C., Chicharro, C., García, E., Ortega, S., Nieto, J., & Cruz, I. (2018). Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(3), e0006277. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006277
- Basiye, F. L., Mbuchi, M., Magiri, C., Kirigi, G., Deborggraeve, S., Schoone, G. J., Saad, A. A., El-Safi, S., Matovu, E., & Wasunna, M. K. (2010). Sensitivity and specificity of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 15(7), 806–810. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02548.x
- Bhandare, P., Shukla, P., Bhoje, M., & Pai, V. V. (2014). Post-kala-Azar dermal leishmaniasis: A diagnostic dilemma in a nonendemic area. *Indian dermatology online journal*, 5(Suppl 2), S122–S124. https://doi.org/10.4103/2229-5178.146190
- Bhattacharyya, T., Marlais, T., & Miles, M. A. (2017). Diagnostic antigens for visceral leishmaniasis: clarification of nomenclatures. *Parasites & vectors*, 10(1), 178. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2120-x
- Boelaert, M., Rijal, S., Regmi, S., Singh, R., Karki, B., Jacquet, D., Chappuis, F., Campino, L., Desjeux, P., Le Ray, D., Koirala, S., & Van der Stuyft, P. (2004). A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(1), 72–77.



- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet* (London, England), 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Crovetto-Martínez, R., Aguirre-Urizar, J. M., Orte-Aldea, C., Araluce-Iturbe, I., Whyte-Orozco, J., & Crovetto-De la Torre, M. A. (2015). Mucocutaneous leishmaniasis must be included in the differential diagnosis of midline destructive disease: two case reports. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 119(1), e20–e26. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2014.09.008>
- Da Silva, M. A. L., Pedrosa Soares, C. R., Medeiros, R. A., Medeiros, Z., & de Melo, F. L. (2013). Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 134(2), 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.003>
- David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, Vol. 22, pp. 491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>
- Davies, C. R., Kaye, P., Croft, S. L., & Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: New approaches to disease control. *British Medical Journal*, Vol. 326, pp. 377–382. <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7385.377>
- de Avelar, D. M., Carvalho, D. M., & Rabello, A. (2019). Development and Clinical Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. *BioMed research international*, 2019, 8240784. <https://doi.org/10.1155/2019/8240784>
- De Carvalho, F. L. N., Riboldi, E. de O., Bello, G. L., Ramos, R. R., Barcellos, R. B., Gehlen, M., ... Rossetti, M. L. R. (2018). Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiology and Infection*, 146(05), 571–576. doi:10.1017/s0950268818000225
- De Doncker, S., Hutse, V., Abdellati, S., Rijal, S., Singh Karki, B. M., Decuyper, S., ... Dujardin, J.-C. (2005). A new PCR–ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(1), 25–31. doi:10.1016/j.trstmh.2004.01.015
- de Paiva-Cavalcanti, M., de Moraes, R. C., Pessoa-E-Silva, R., Trajano-Silva, L. A., Gonçalves-de-Albuquerque, S., Tavares, D., Brelaz-de-Castro, M. C., Silva, R., & Pereira, V. R. (2015). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & bioscience*, 5, 31. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>

de Vries, H. J., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. (2015). Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology*, 16(2), 99–109. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>

Deborggraeve, S., Laurent, T., Espinosa, D., Van der Auwera, G., Mbuchi, M., Wasunna, M., El-Safí, S., Al-Basheer, A. A., Arévalo, J., Miranda-Verástegui, C., Leclipteux, T., Mertens, P., Dujardin, J. C., Herdewijn, P., & Büscher, P. (2008). A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, 198(10), 1565–1572. <https://doi.org/10.1086/592509>

Deepachandi, B., Weerasinghe, S., Soysa, P., Karunaweera, N., & Siriwardana, Y. (2019). A highly sensitive modified nested PCR to enhance case detection in leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 623. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4180-3>

Dvorak, V., Hlavackova, K., Kocisova, A., & Volf, P. (2016). First record of *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* in Slovakia. Première mention de *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* en Slovaquie. *Parasite* (Paris, France), 23, 48. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016061>

Elmahallawy, E. K., Sampedro Martinez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M., & Gutierrez Fernandez, J. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *Journal of infection in developing countries*, 8(8), 961–972. <https://doi.org/10.3855/jidc.4310>

Espinosa, D., Boggild, A. K., Deborggraeve, S., Laurent, T., Valencia, C., Pacheco, R., Miranda-Verástegui, C., Llanos-Cuentas, A., Leclipteux, T., Dujardin, J. C., Büscher, P., & Arévalo, J. (2009). *Leishmania* OligoC-TesT as a simple, rapid, and standardized tool for molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Journal of clinical microbiology*, 47(8), 2560–2563. <https://doi.org/10.1128/JCM.00259-09>

Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M., & Shaw, J. J. (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, 145(4), 430–442. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>

Farahmand, M., Nahrevanian, H., Khalaj, V., Mohebbi, M., Barati, M., Naderi, S., Zarei, Z., & Khalili, G. (2018). Assessment of Recombinant A2-Latex Agglutination Test (RA2-LAT) and RA2-ELISA for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis: A Comparative Field Study with Direct Agglutination Test in Northwestern Iran. *Iranian journal of parasitology*, 13(2), 172–179.

Fararouei, M., Sarkari, B., Abdolahi Khabisi, S., & Rezaei, Z. (2018). Diagnostic accuracy of urinary latex agglutination test (KAtex) for the diagnosis of visceral leishmaniasis: A meta-

analysis. *Journal of infection in developing countries*, 12(12), 1045–1051. <https://doi.org/10.3855/jidc.10185>

Fischer, D., Thomas, S. M., & Beierkuhnlein, C. (2010). Temperature-derived potential for the establishment of phlebotomine sandflies and visceral leishmaniasis in Germany. *Geospatial health*, 5(1), 59–69. <https://doi.org/10.4081/gh.2010.187>

Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M. (2018). Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 11(1). doi:10.1186/s13071-018-2859-8

Gao, C., Ding, D., Wang, J., Steverding, D., Wang, X., Yang, Y., & Shi, F. (2015). Development of a LAMP assay for detection of *Leishmania infantum* infection in dogs using conjunctival swab samples. *Parasites & Vectors*, 8(1). doi:10.1186/s13071-015-0991-2

Gharbi, M., Mhadhbi, M., Rejeb, A., Jaouadi, K., Rouatbi, M., & Darghouth, M. A. (2015). Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 34(2), 613–626. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2384>

Ghorbani, M., & Farhoudi, R. (2017). Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 25–40. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>

Ghosh, P., Hasnain, M. G., Hossain, F., Khan, M. A. A., Chowdhury, R., Faisal, K., ... Mondal, D. (2018). Evaluation of Real-time PCR for Diagnosis of Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis in Endemic Foci of Bangladesh. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(10). doi:10.1093/ofid/ofy234

Gomes, Y. M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R. A., Abath, F. G. C., & Alves, L. C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Veterinary Journal*, Vol. 175, pp. 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.019>

Graça, G. C., Volpini, A. C., Romero, G. A., Oliveira Neto, M. P., Hueb, M., Porrozzi, R., Boité, M. C., & Cupolillo, E. (2012). Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5), 664–674. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000500014>

Hosseinzadeh, M., Omidifar, N., & Lohrasb, M. H. (2012). Use of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the conventional scraping method. *Tropical Doctor*, 42(2), 112–113. <https://doi.org/10.1258/td.2011.110420>

Chaouch, M., Mhadhbi, M., Adams, E. R., Schoone, G. J., Limam, S., Gharbi, Z., Darghouth, M. A., Guizani, I., & BenAbderrazak, S. (2013). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania infantum* in canine leishmaniasis based on cysteine protease B genes. *Veterinary parasitology*, 198(1-2), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.038>

Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., ... Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 5, pp. 873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>

Jamjoom, M. B., Ashford, R. W., Bates, P. A., Chance, M. L., Kemp, S. J., Watts, P. C., & Noyes, H. A. (2004). *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and "*L. archibaldi*" from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitology*, 129(Pt 4), 399–409. <https://doi.org/10.1017/s0031182004005955>

Kato, H., Gomez, E. A., Seki, C., Furumoto, H., Martini-Robles, L., Muzzio, J., ... Hashiguchi, Y. (2019). PCR-RFLP analyses of *Leishmania* species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007403. [doi:10.1371/journal.pntd.0007403](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007403)

Khalil, E. A., Ayed, N. B., Musa, A. M., Ibrahim, M. E., Mukhtar, M. M., Zijlstra, E. E., Elhassan, I. M., Smith, P. G., Kieny, P. M., Ghalib, H. W., Zicker, F., Modabber, F., & Elhassan, A. M. (2005). Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. *Clinical and experimental immunology*, 140(2), 349–353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02768.x>

Kirstein, O. D., Abbasi, I., Horwitz, B. Z., Skrip, L., Hailu, A., Jaffe, C., Li, L. L., Prow, T. W., & Warburg, A. (2017). Minimally invasive microbiopsies: a novel sampling method for identifying asymptomatic, potentially infectious carriers of *Leishmania donovani*. *International journal for parasitology*, 47(10-11), 609–616. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.02.005>

Konstantinou, G. N. (2017). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Food Allergens*, 79–94. [doi:10.1007/978-1-4939-6925-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6925-8_7)

Kumar, A., Boggula, V. R., Misra, P., Sundar, S., Shasany, A. K., & Dube, A. (2010). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis is useful for distinguishing *Leishmania* species of visceral and cutaneous forms. *Acta Tropica*, 113(2), 202–206. [doi:10.1016/j.actatropica.2009.10.006](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.006)

- Laurent, T., Van der Auwera, G., Hide, M., Mertens, P., Quispe-Tintaya, W., Deborggraeve, S., ... Dujardin, J. C. (2009). Identification of Old World *Leishmania* spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.10.015>
- Le Rutte, E. A., Zijlstra, E. E., & de Vlas, S. J. (2019). Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis as a Reservoir for Visceral Leishmaniasis Transmission. *Trends in parasitology*, 35(8), 590–592. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.007>
- Maia, C., & Depaquit, J. (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? Le genre *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) peut-il jouer un rôle dans la transmission des *Leishmania* infestant les mammifères ?. *Parasite* (Paris, France), 23, 55. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016062>
- Maia, Z., Lírio, M., Mistro, S., Mendes, C. M., Mehta, S. R., & Badaro, R. (2012). Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(1), e1484. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001484>
- Manfredi, M., & Iuliano, S. (2016). Cutaneous Leishmaniasis with Long Duration and Bleeding Ulcer. *Clinical Microbiology: Open Access*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000229>
- Manzur, A., & Bari, A. U. (2006). Sensitivity of leishmanin skin test in patients of acute cutaneous leishmaniasis. *Dermatology online journal*, 12(4), 2.
- Marfurt, J., Niederwieser, I., Makia, N. D., Beck, H.-P., & Felger, I. (2003). Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46(2), 115–124. doi:10.1016/s0732-8893(03)00040-3
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, Vol. 27, pp. 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- Marra, F., Chiappetta, M. C., & Vincenti, V. (2014). Ear, nose and throat manifestations of mucocutaneous Leishmaniasis: a literature review. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, 85(1), 3–7.
- Maurício, I. L. (2018). *Leishmania* taxonomy. In *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases* (pp. 15–30). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_2)

- Medeiros, F. A. C., Gomes, L. I., Oliveira, E., de Souza, C. S. A., Mourão, M. V., Cota, G. F., Rabello, A. (2017). Development and Validation of a PCR-ELISA for the Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Journal of Tropical Medicine*, 2017, 1–10. doi:10.1155/2017/7364854
- Mikaeili, F., Fakhar, M., Sarkari, B., Motazedian, M. H., & Hatam, G. (2007). Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain. *Iranian journal of immunology : IJI*, 4(2), 116–121.
- Mohammadi, M. A., Bamorovat, M., Fasihi Harandi, M., Karimi, T., Sharifi, I., & Aflatoonian, M. R. (2017). Comparison of Three PCR-based Methods for Simplicity and Cost Effectiveness Identification of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania tropica*. *Iranian Journal of Parasitology*, 12(2), 215–223. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28761481>
- Mohammadiha, A., Dalimi, A., Mahmoodi, M. R., Parian, M., Pirestani, M., & Mohebbali, M. (2017). The PCR-RFLP-Based Detection and Identification of the *Leishmania* Species Causing Human Cutaneous Leishmaniasis in the Khorasan-Razavi Province, Northeast of Iran. *Journal of arthropod-borne diseases*, 11(3), 383–392.
- Mohammadiha, A., Haghghi, A., Mohebbali, M., Mahdian, R., Abadi, A. R., Zarei, Z., Yeganeh, F., Kazemi, B., Taghipour, N., Akhoundi, B., Barati, M., & Mahmoudi, M. R. (2013). Canine visceral leishmaniasis: a comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. *Veterinary parasitology*, 192(1-3), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.013>
- Mokni M. (2019). Leishmanioses cutanées [Cutaneous leishmaniasis]. *Annales de dermatologie et de venereologie*, 146(3), 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2019.02.002>
- Mondal, D., Bern, C., Ghosh, D., Rashid, M., Molina, R., Chowdhury, R., Nath, R., Ghosh, P., Chapman, L., Alim, A., Bilbe, G., & Alvar, J. (2019). Quantifying the Infectiousness of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Toward Sand Flies. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 69(2), 251–258. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy891>
- Mondal, S., Bhattacharya, P., & Ali, N. (2010). Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(8), 919–944. <https://doi.org/10.1586/eri.10.78>
- Mugasa, C. M., Deborggraeve, S., Schoone, G. J., Laurent, T., Leeflang, M. M., Ekangu, R. A., Schallig, H. D. F. H. (2010). Accordance and concordance of PCR and NASBA followed by oligochromatography for the molecular diagnosis of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania*.

Tropical Medicine & International Health, 15(7), 800–805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02547.x>

Munstermann, L. E. (2019). Phlebotomine Sand Flies and Moth Flies (Psychodidae). *Medical and Veterinary Entomology*, 191–211. doi:10.1016/b978-0-12-814043-7.00012-1

Nzelu, C. O., Kato, H., & Peters, N. C. (2019). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of Leishmania infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(11), e0007698. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007698>

Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T., & Gradoni, L. (2006). 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1318–1322. doi:10.1128/jcm.44.4.1318-1322.2006

Otranto, D., Paradies, P., Sasanelli, M., Spinelli, R., & Brandonisio, O. (2004). Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology*, 42(6), 2769–2770. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2769-2770.2004>

Ovalle-Bracho, C., Camargo, C., Díaz-Toro, Y., & Parra-Muñoz, M. (2018). Molecular typing of Leishmania (Leishmania) amazonensis and species of the subgenus Viannia associated with cutaneous and mucosal leishmaniasis in Colombia: A concordance study. *Biomédica*, 38(1), 86. doi:10.7705/biomedica.v38i0.3632

Paltrinieri, S., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A., & Zini, E. (2016). Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary clinical pathology*, 45(4), 552–578. <https://doi.org/10.1111/vcp.12413>

Pattabhi, S., Whittle, J., Mohamath, R., El-Safi, S., Moulton, G. G., Guderian, J. A., ... Bhatia, A. (2010). Design, Development and Evaluation of rK28-Based Point-of-Care Tests for Improving Rapid Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(9), e822. doi:10.1371/journal.pntd.0000822

Pereira, M. R., Rocha-Silva, F., Graciele-Melo, C., Lafuente, C. R., Magalhães, T., & Caligorne, R. B. (2014). Comparison between Conventional and Real-Time PCR Assays for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *BioMed Research International*, 2014, 1–4. doi:10.1155/2014/639310

- Quaresma, P. F., Murta, S. M. F., de Castro Ferreira, E., da Rocha-Lima, A. C. V. M., Xavier, A. A. P., & Gontijo, C. M. F. (2009). Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, 111(3), 289–294. doi:10.1016/j.actatropica.2009.05.008
- Ravindran, R., Anam, K., Bairagi, B. C., Saha, B., Pramanik, N., Guha, S. K., Goswami, R. P., Banerjee, D., & Ali, N. (2004). Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. *Infection and immunity*, 72(2), 863–870. <https://doi.org/10.1128/iai.72.2.863-870.2004>
- Ready, P. D., & Rogers, M. E. (2013). Behaviour of sandflies infected with *Leishmania*. *Ecology of Parasite-Vector Interactions*, 167–178. doi:10.3920/978-90-8686-744-8\_9
- Reithinger, R., & Dujardin, J. C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Journal of clinical microbiology*, 45(1), 21–25. <https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>
- Ribeiro, R. R., Michalick, M. S. M., da Silva, M. E., dos Santos, C. C. P., Frézard, F. J. G., & da Silva, S. M. (2018). Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*, 2018, 1–12. doi:10.1155/2018/3296893
- Ryan, J. R., Smithyman, A. M., Rajasekariah, G. H., Hochberg, L., Stiteler, J. M., & Martin, S. K. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology*, 40(3), 1037–1043. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.3.1037-1043.2002>
- Saad, A. A., Ahmed, N. G., Osman, O. S., Al-Basheer, A. A., Hamad, A., Deborggraeve, S., ... El-Safi, S. (2010). Diagnostic Accuracy of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-Oligochromatography for Diagnosis of Leishmaniasis in Sudan. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8), e776. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000776>
- Saadabadi, F., Mohajery, M., Poostchi, E., & Shamsian, S. A. (2013). Identification of *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in Kharve, Iran. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 1(2), 69–73.
- Sereno D. (2019). *Leishmania* (*Mundinia*) spp.: from description to emergence as new human and animal *Leishmania* pathogens. *New microbes and new infections*, 30, 100540. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100540>



Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *Journal of vector borne diseases*, 49 1, 54 .

Schallig, H. D., Schoone, G. J., Beijer, E. G., Kroon, C. C., Hommers, M., Ozbel, Y., Ozensoy, S., da Silva, E. S., Cardoso, L. M., & da Silva, E. D. (2002). Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-Leishmania antibodies in dogs. *Veterinary parasitology*, 109(1-2), 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00268-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00268-6)

Schönian, G., Kuhls, K., & Mauricio, I. L. (2011). Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. *Parasitology*, Vol. 138, pp. 405–425. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001538>

Schönian, G., Mauricio, I. L., & Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of Leishmania? *Trends in Parasitology*, Vol. 26, pp. 466–469. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.013>

Singh, D. P., Goyal, R. K., Singh, R. K., Sundar, S., & Mohapatra, T. M. (2010). In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of kala-azar. *Journal of health, population, and nutrition*, 28(3), 281–285. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v28i3.5557>

Singh, D., Pandey, K., Das, V. N., Das, S., Verma, N., Ranjan, A., Lal, S. C., Topno, K. R., Singh, S. K., Verma, R. B., Kumar, A., Sardar, A. H., Purkait, B., & Das, P. (2013). Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region of India. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88(2), 222–226. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0489>

Singh, O. P., & Sundar, S. (2015). Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era. *Journal of parasitology research*, 2015, 239469. <https://doi.org/10.1155/2015/239469>

Singh, S., Dey, A., & Sivakumar, R. (2005). Applications of molecular methods for Leishmania control. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 251–265. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.251>

Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., & The LeishVet Group (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*, 4, 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>

Sousa, A. Q., Pompeu, M. M. L., Frutuoso, M. S., Lima, J. W. O., Tinel, J. M. B. M., & Pearson, R. D. (2014). Short report: Press Imprint Smear: A rapid, simple, and cheap method for

the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(5), 905–907. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0160>

Sreenivas, G., Ansari, N. A., Kataria, J., & Salotra, P. (2004). Nested PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in slit aspirates from post-kala-azar dermal Leishmaniasis Lesions. *Journal of clinical microbiology*, 42(4), 1777–1778. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.4.1777-1778.2004>

Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., & Sundar, S. (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 105, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>

Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, Vol. 10, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

Stockdale, L., & Newton, R. (2013). A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6), e2278. doi:10.1371/journal.pntd.0002278

Sudarshan, M., & Sundar, S. (2014). Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(1), 40–42. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.031

Sue, M. J., Yeap, S. K., Omar, A. R., & Tan, S. W. (2014). Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *BioMed research international*, 2014, 653014. <https://doi.org/10.1155/2014/653014>

Sundar, S., & Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5), 951–958. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002>

Sundar, S., & Singh, O. P. (2018). Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 22(4), 443–457. doi:10.1007/s40291-018-0343-y

Taslimi, Y., Sadeghipour, P., Habibzadeh, S., Mashayekhi, V., Mortazavi, H., Müller, I., Lane, M. E., Kropf, P., & Rafati, S. (2017). A novel non-invasive diagnostic sampling technique for cutaneous leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(7), e0005750. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005750>

TAUNS. (2007). Principal of immunochromatography kit. Tauns Laboratories. <http://www.tauns.co.jp/english/gijutsu/index.php>

Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of Parasitic Diseases*, Vol. 44, pp. 253–272. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>

Toledo, A., Martín-Sánchez, J., Pesson, B., Sanchiz-Marín, C., & Morillas-Márquez, F. (2002). Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 119(2), 257–264. doi:10.1016/s0166-6851(01)00424-8

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

Travi, B. L., Cordeiro-da-Silva, A., Dantas-Torres, F., & Miró, G. (2018). Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(1), e0006082. doi:10.1371/journal.pntd.0006082

Vaish, M., Singh, O. P., Chakravarty, J., & Sundar, S. (2012). rK39 antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis by using human saliva. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(4), 598–600. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0127>

van der Meide, W. F., Schoone, G. J., Faber, W. R., Zeegelaar, J. E., de Vries, H. J., Ozbel, Y., Lai A Fat, R. F., Coelho, L. I., Kassi, M., & Schallig, H. D. (2005). Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *Journal of clinical microbiology*, 43(11), 5560–5566. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5560-5566.2005>

Verma, S., Avishek, K., Sharma, V., Negi, N. S., Ramesh, V., & Salotra, P. (2013). Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(4), 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.011>

Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., Actor, J. K., & Dasgupta, A. (2017). Antigen and Antibody Testing. *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*, 221–232. doi:10.1016/b978-0-12-805351-5.00011-9

Welch, R. J., Anderson, B. L., & Litwin, C. M. (2008). Rapid immunochromatographic strip test for detection of anti-K39 immunoglobulin G antibodies for diagnosis of visceral

leishmaniasis. *Clinical and vaccine immunology* : CVI, 15(9), 1483–1484. <https://doi.org/10.1128/CVI.00174-08>

WHO. Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis & World Health Organization. (2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>

WHO. Leishmaniasis. Retrieved April 24, 2020, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Radu, S., & Chee, H. Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of applied microbiology*, 124(3), 626–643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>

Zanoli, L., & Spoto, G. (2012). Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices. *Biosensors*, 3(1), 18–43. <https://doi.org/10.3390/bios3010018>

Zemanová, E., Jirků, M., Mauricio, I. L., Miles, M. A., & Lukes, J. (2004). Genetic polymorphism within the leishmania donovani complex: correlation with geographic origin. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(6), 613–617.

Zeyrek, F. Y., Töz, S., Yuksel, F., Turgay, N., & Ozbel, Y. (2018). The Comparison of Kinetoplastid DNA PCR and Parasitological Methods in the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis Using Clinical Samples of Suspected Patients in Turkey. *International Journal of Infectious Diseases*, 73, 317. doi:10.1016/j.ijid.2018.04.4135

Zijlstra, E. E., Khalil, E. A., Kager, P. A., & El-Hassan, A. M. (2000). Post-kala-azar dermal leishmaniasis in the Sudan: clinical presentation and differential diagnosis. *The British journal of dermatology*, 143(1), 136–143. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03603.x>

Zribi, L., El-Goulli, A. F., Ben-Abid, M., Gharbi, M., Ben-Sghaier, I., Boufaden, I., Aoun, K., & Bouratbine, A. (2017). Use of an Interferon Gamma Release Assay (IGRA) to test T-cell responsiveness to soluble *Leishmania infantum* antigen in whole blood of dogs from endemic areas. *Veterinary parasitology*, 246, 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.029>