

VALIDAZIONE DI UN NUOVO TEST ELISA BASATO SU UN ANTIGENE RICOMBINANTE PER LA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA *LEISHMANIA INFANTUM*

EVALUATION OF A NEW ELISA BASED ON A RECOMBINANT PROTEIN FOR THE DIAGNOSIS OF *LEISHMANIA INFANTUM* INFECTION

ALESSANDRA BOARINO¹, ENRICO BOLLO², LAURA PRUNOTTO¹, LORENA CANALE¹,
FEDERICA USLENGHI², PAOLO POLETTI¹

¹ Agrolabo S.p.A., Scarmagno (TO), Italy

² Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino

Riassunto

Obiettivi - Il presente lavoro ha come obiettivo la messa a punto e la validazione di un nuovo test ELISA commerciale per la determinazione di anticorpi circolanti contro *Leishmania* nel cane, basato su una proteina ricombinante comprendente differenti antigeni di *L. infantum*.

Materiali e metodi - 227 campioni di siero o plasma di cane, infetti e non infetti da *Leishmania infantum*, sono stati analizzati in parallelo con il nuovo test ELISA ricombinante, con un altro test ELISA presente in commercio e con il test di riferimento dell'immunofluorescenza indiretta (IFI).

Risultati - I 227 sieri analizzati sono stati classificati 126 come positivi e 101 come negativi dal test IFI. Dei 126 sieri positivi in IFI, il nuovo test ELISA ricombinante ne ha identificati correttamente 104 (sensibilità 82,5%), mentre il test ELISA tradizionale 112 (sensibilità 88,9%). Dei 101 sieri negativi in IFI, i due test ELISA ne hanno identificati correttamente rispettivamente 98 (specificità 97,0%) e 79 (specificità 78,2%). La concordanza osservata con il test IFI è risultata dell'89,0% per il test ELISA ricombinante e dell'84,1% per il test ELISA tradizionale.

Conclusioni - I risultati dimostrano una maggiore specificità del test ELISA ricombinante ed una più elevata concordanza con il test di riferimento IFI. In ragione dell'elevato grado di purificazione, gli antigeni ricombinanti migliorano in modo significativo la specificità dei test diagnostici. La strategia di unire differenti antigeni di *Leishmania* in un'unica proteina di fusione, aumentando il numero di determinanti antigenici disponibili per gli anticorpi, ha permesso di ottenere anche un'elevata sensibilità del test.

Summary

Objectives - The objective of this work was to develop and to validate a new commercial ELISA test to evaluate canine antibodies against *Leishmania*. The new ELISA is based on a recombinant protein obtained by joining different antigens of *L. infantum*.

Materials and methods - 227 sera of dogs, infected and uninfected by *Leishmania infantum*, were analysed in parallel with the new recombinant ELISA test, another traditional ELISA test and the reference indirect immunofluorescence test (IFAT).

Results - Of the 227 analysed sera, 126 were classified as positive and 101 as negative by IFAT. Among the 126 IFAT positive sera, the new recombinant ELISA correctly detected 104 samples (sensitivity: 82.5%), while the traditional ELISA correctly classified 112 sera (sensitivity: 88.9%). Among the 101 IFAT negative sera, the two ELISA tests correctly classified 98 (specificity: 97.0%) and 79 (specificity: 78.2%) samples respectively. The observed concordance with the IFAT test resulted 89.0% for the recombinant ELISA and 84.1% for the traditional ELISA.

Conclusions - The results demonstrate a higher specificity of the new recombinant ELISA test, with a greater agreement with the reference test (IFAT). As a result of the high purification grade, recombinant antigens significantly improve the specificity of diagnostic tests. The strategy to combine different *Leishmania* antigens in a single fusion protein enhanced the number of epitopes for the antibody binding and consequently increased the test sensitivity.

INTRODUZIONE

Le Leishmaniosi Viscerali (LV) sono gravi patologie che interessano diverse specie di mammiferi, compreso l'uomo, causate dall'infezione di protozoi emoflagellati appartenenti al genere *Leishmania*. I cani domestici ed i canidi selvatici rappresentano l'ospite serbatoio principale di Leishmaniosi Viscerali Zoonosiche (LVZ), causate da *Leishmania infantum*.¹ La varietà e complessità dei sintomi clinici nel cane e la presenza di animali asintomatici, ma tuttavia infetti, rendono piuttosto complessa la diagnosi clinica della Leishmaniosi.^{2,3} Poiché l'esame parassitologico (a partire da puntato midollare, linfonodale o splenico, o da una biopsia di lesione cutanea) richiede esperienza e non è correntemente eseguibile in sede ambulatoriale, si ricorre solitamente alla sierologia, tecnica atta ad identificare gli anticorpi circolanti anti-*Leishmania*.

Tra i metodi sierologici, il test dell'immunofluorescenza indiretta (IFI) è oggi considerato il saggio di riferimento per la diagnosi di leishmaniosi canina⁴, poiché possiede elevate sensibilità e specificità, pari rispettivamente al 98,4-99,5% e al 100% per campioni con titolo anticorpale uguale o maggiore di 1:160.⁵ Tali valori, tuttavia, diminuiscono nella valutazione dei campioni borderline con titolo anticorpale pari a 1:40 o 1:80. La cosiddetta "zona grigia" per l'interpretazione dei campioni positivi è un comune problema per il test IFI in molti laboratori, che riportano come valori soglia titoli fino a 1:160.⁶

Il test IFI presenta alcuni inconvenienti: non è eseguibile routinariamente in sede ambulatoriale in quanto necessita del microscopio a fluorescenza, è caratterizzato da una "finestra" di dubbio piuttosto ampia e rileva con maggiore accuratezza soggetti in stadio avanzato di infezione, sia sintomatici, sia asintomatici. Ulteriori limiti del test IFI sono rappresentati dalla standardizzazione delle preparazioni di antigeni, dall'interpretazione soggettiva del risultato, dalla definizione della soglia di positività, dall'accuratezza *inter-laboratorio* e dalla precisione *intra-laboratorio*.^{7,8} Infine, va considerato che gli antigeni utilizzati per il test IFI sono prodotti a partire da colture in vitro di *Leishmania* in fase promastigote, cioè nello stadio del ciclo biologico all'interno del vettore, mentre l'ospite vertebrato reagisce dal punto di vista immunologico con *Leishmania* in fase amastigote.

Il test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) rappresenta un valido strumento alternativo per la diagnosi sierologica, poiché è maggiormente standardizzabile ed applicabile per screening su larga scala.⁹ Inoltre, la lettura spettrofotometrica consente una più oggettiva interpretazione dei risultati. La specificità e la sensibilità del test ELISA sono tuttavia strettamente dipendenti dal tipo di antigene utilizzato e dal suo grado di purificazione.¹⁰

L'utilizzo di preparazioni crude di promastigoti interi o di estratti solubili di promastigoti può limitare la standardizzazione del test e la riproducibilità dei risultati del test ELISA. È stato infatti dimostrato che, nonostante siano caratterizzati da un'elevata sensibilità, gli antigeni estratti da promastigoti possono presentare fenomeni di cross-reazione verso altri microrganismi quali *Trypanosoma cruzi*, *Dipetalonema reconditum* e *Babesia canis*.¹¹

Recentemente, numerosi antigeni ricombinanti di *L. infantum* sono stati caratterizzati ed utilizzati per sviluppare test ELISA.^{11,12,13} Le prestazioni di questi test sono state

confrontate con quelle dei test tradizionali basati su estratti grezzi di promastigoti, dimostrando una maggiore specificità dei test ELISA ricombinanti.^{14,6,13}

L'utilizzo delle tecniche molecolari per l'espressione e la purificazione di proteine ricombinanti, altamente specifiche, costituisce, pertanto, un valido contributo al fine di migliorare la performance dei test ELISA.^{7,15}

Il presente lavoro ha come obiettivo la valutazione delle prestazioni di un test ELISA basato sulla determinazione di anticorpi circolanti contro *Leishmania* mediante un antigene di cattura ricombinante comprendente differenti antigeni di *L. infantum*. La valutazione è stata effettuata rispetto al test di riferimento IFI e ad un analogo test ELISA tradizionale presente sul mercato.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati selezionati 227 campioni di siero o plasma di cane, dei quali 126 positivi, 74 negativi al test IFI e 27 con titolo IFI pari a 1:40 (dubbi). La raccolta dei campioni è stata effettuata nel corso dell'anno 2005, da animali appartenenti a privati, dei quali non è disponibile un'anamnesi ed un quadro clinico completo. Tutti i campioni, classificati mediante test IFI (Fluo *Leishmania*-Megacor), sono stati sottoposti all'analisi con i due test ELISA.

Leishmacheck RP

Tutti i campioni sono stati analizzati seguendo le istruzioni incluse nel kit commerciale.

Il test Leishmacheck RP (Agrolabo, Scarmagno, Italia) è basato sulla tecnica immunoenzimatica indiretta (ELISA). Piastre di polistirene sono state sensibilizzate con 100 ng/pozzetto di antigene ricombinante ottenuto mediante la fusione di tre porzioni antigeniche immunodominanti di *L. infantum*. Tali epitopi immunodominanti, riconosciuti dalle cellule B dell'ospite infetto, sono espressi sia nella fase promastigote sia nella fase amastigote del ciclo di vita di *L. infantum*.

Se nel campione in esame sono presenti anticorpi specifici anti-*Leishmania*, essi si legano all'antigene fissato alla fase solida, formando il complesso antigene-anticorpo. Dopo un primo ciclo di lavaggio per eliminare il materiale non legato, viene aggiunto un anticorpo secondario coniugato con perossidasi diretto verso le IgG canine. Il coniugato, legatosi al complesso antigene-anticorpo, viene rivelato aggiungendo il substrato-cromogeno che, in presenza dell'enzima perossidasi, sviluppa una reazione di colore azzurro. All'osservazione visiva i campioni positivi risultano di colore azzurro, mentre i campioni negativi appaiono incolori. L'aggiunta della soluzione di stop fa virare il colore dei pozzetti nel giallo ed è indicata per la lettura allo spettrofotometro a 450 nm.

La lettura dei risultati ottenuti è stata effettuata spettrofotometricamente e i valori di assorbanza (OD: Optical Density) dei campioni sono stati valutati in funzione del valore di OD del controllo negativo (OD del campione/OD del controllo negativo).

Il valore soglia per considerare un campione positivo è stato stabilito a 5.

Precisione ed accuratezza del test Leishmacheck RP

È stato utilizzato un approccio parziale teso a fornire informazioni di base su precisione ed accuratezza del test utilizzato. Allo scopo di valutare la precisione del test Leishmacheck RP sono state effettuate prove *inter-* e *intra-*test utilizzando tre sieri positivi a differente titolo IFI ed un siero negativo. La precisione *intra-*test è stata valutata eseguendo 15 repliche di quattro sieri a differente titolo anticorpale in pozzetti della medesima piastra ELISA; l'accuratezza *inter-*test è stata invece valutata effettuando repliche di quattro sieri a differente titolo anticorpale in pozzetti appartenenti a 12 lotti diversi di piastre. Il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato come rapporto tra le medie dei valori e la deviazione standard per ciascuno dei sieri.

Un altro parametro valutato in sede di messa a punto del test è l'accuratezza mediante linearità di risposta del test ELISA in rapporto a diluizioni scalari di sieri positivi (a differente titolo IFI: 1:600 e 1:1200). Il valore di OD ottenuto da diluizioni seriali è stato correlato con il valore stesso della diluizione.

Determinazione delle prestazioni del test Leishmacheck RP

I valori di sensibilità (Se) e di specificità (Sp)¹⁷ del test Leishmacheck RP e del test Leishmania-96 sono stati valutati in rapporto ai risultati del test IFI, considerato come test di riferimento. Per entrambi i test ELISA, rispetto al test IFI, sono state inoltre calcolate la concordanza osservata, la concordanza (k) ed il relativo intervallo di confidenza (IC).¹⁷

Leishmania-96

Tutti i campioni sono stati analizzati seguendo le istruzioni incluse nel kit commerciale.

Il test Leishmania-96 (Agrolabo, Scarmagno, Italia) è basato sullo stesso principio del test Leishmacheck RP, con la differenza che le piastre ELISA sono sensibilizzate con antigeni di promastigoti di *Leishmania*.

Dopo l'incubazione dei campioni diluiti 1:100 nella soluzione diluente fornita con il kit, si provvede all'aggiunta del coniugato.

In seguito all'aggiunta del substrato-cromogeno, si sviluppa una colorazione blu per i campioni positivi, mentre i campioni negativi risultano incolori. L'interpretazione dei risultati è effettuata calcolando i valori soglia positivo (OD del controllo positivo x 0,35) e negativo (OD del controllo positivo x 0,3). Il titolo del siero di controllo positivo fornito dal kit, ottenuto da cani con infezione di *L. infantum* accertata parassitologicamente, è 1:200.

I campioni con valore di OD > valore soglia positivo sono da considerarsi positivi, quelli con valore di OD < valore soglia negativo sono da considerarsi negativi, quelli con OD compresa (o uguale) tra i due valori sono da considerarsi dubbi.

L'imprecisione *intra-*test ed *inter-*test del kit Leishmania-96, espressa in termini di CV, è risultata essere compresa rispettivamente nei seguenti range: 3,5-7,5% e 3,5-8%.

IFI

Tutti i campioni utilizzati per lo studio sono stati sottoposti al test di immunofluorescenza indiretta (IFI), utilizzato come test di riferimento, seguendo il protocollo indicato dal produttore (Fluo Leishmania-Megacor, Hörbranz, Austria). Come valore soglia per determinare la positività dei campioni, è stata considerata la diluizione 1:40.

RISULTATI

Precisione ed accuratezza del test Leishmacheck RP

I risultati delle prove di precisione *intra-*test ed accuratezza *inter-*test sono riassunti nelle Tabelle 1 e 2, che mostrano come il valore del coefficiente di variazione (CV) relativo a tre sieri positivi con diverso titolo IFI ed un siero negativo, sia sempre inferiore al 10%. Il risultato della valutazione di accuratezza del test mediante il calcolo della regressione lineare tra le assorbanze di 2 sieri positivi diluiti scalarmente e la diluizione stessa, è riportato nella Figura 1b. In Figura 1a sono riportati i dati che dimostrano la rispondenza della correlazione rilevata al modello lineare.

Prestazioni dei test Leishmacheck RP e Leishmania-96

Per una prima valutazione di sensibilità e specificità dei test Leishmacheck RP e Leishmania-96, sono stati considerati tutti i sieri saggiati in IFI.

Tabella 1

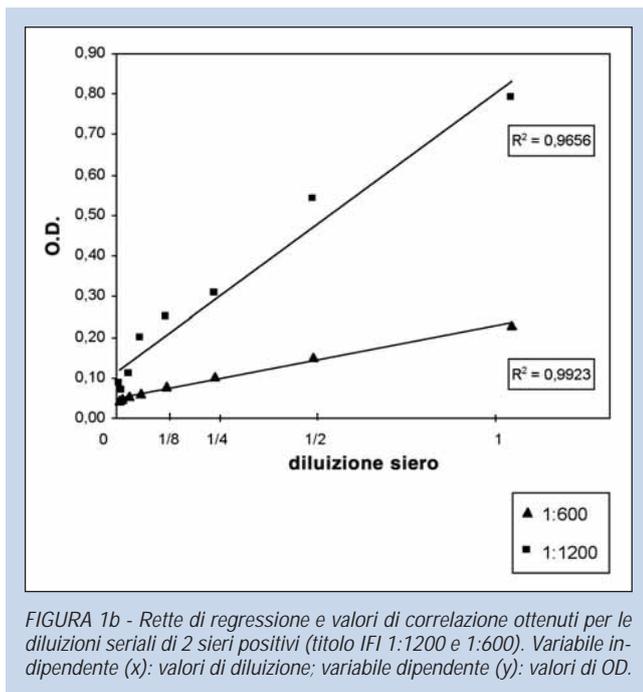
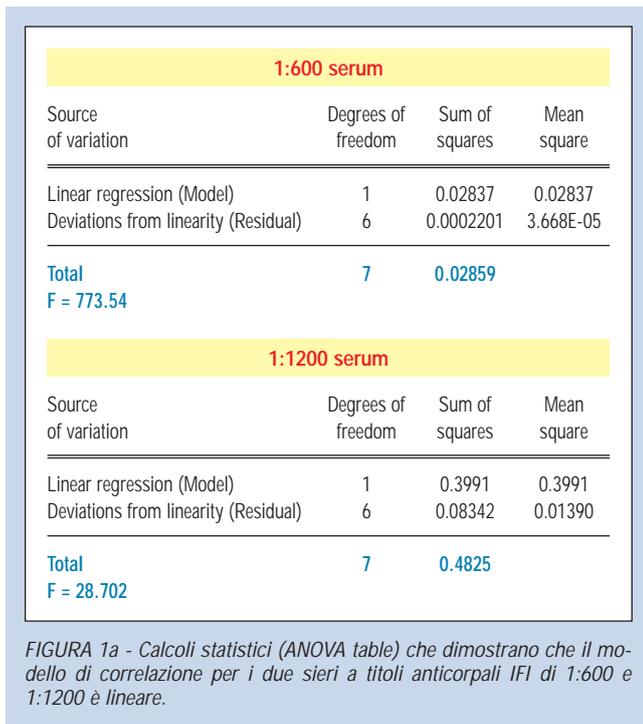
Precisione *intra-*piastra: la tabella mostra i valori di CV calcolati per 15 repliche di tre sieri positivi a diverso titolo IFI (1:1280, 1:640, 1:320) ed un siero negativo

Titolo IFI	N° repliche	Media	Dev. std.	CV
1:1280	15	0,939	0,078	8,3
1:640	15	0,673	0,047	7,0
1:320	15	0,310	0,018	5,8
neg	15	0,043	0,003	6,5

Tabella 2

Precisione *inter-*piastra: la tabella mostra i valori di CV calcolati per 12 repliche di tre sieri positivi a diverso titolo IFI (1:1280, 1:640, 1:320) ed un siero negativo

Titolo IFI	N° repliche	Media	Dev. std.	CV
1:1280	12	1,513	0,119	7,8
1:640	12	0,944	0,059	6,3
1:320	12	0,330	0,031	9,4
neg	12	0,039	0,003	6,9



I 227 sieri analizzati sono stati classificati 126 come positivi e 101 come negativi dal test IFI. I risultati ottenuti con i test Leishmacheck RP e Leishmania-96 sono riportati nella Tabella 3. I 22 campioni non classificati correttamente come negativi dal test Leishmania-96 sono risultati 11 positivi e 11 dubbi con il test Leishmacheck RP. Il test Leishmacheck RP ha dimostrato una specificità del 97,0% (IC 95%: 0,94-1,00) ed una sensibilità dell'82,5% (IC 95%: 0,76-0,89) rispetto al test Leishmania-96, che ha evidenziato valori rispettivamente del 78,2% (IC 95%: 0,78-0,92) e dell'88,9% (IC 95%: 0,70-0,86). La concordanza osservata con il test IFI è risultata dell'89,0% ($k=0,79$; IC 95%: 0,74-0,84) per il Leishmacheck RP e dell'84,1% ($k=0,68$; IC 95%: 0,60-0,74) per il Leishmania-96.

Tabella 3
Tabella relativa al confronto dei test Leishmacheck RP e Leishmania-96 con il test IFI su un pannello di 227 sieri di cane

IFI	LEISHMACHECK RP		LEISHMANIA-96		Totale
	POS	NEG	POS	NEG	
POS	104	22	112	14	126
NEG	3	98	22*	79	101
tot	107	120	134	93	227

*di cui 11 positivi e 11 dubbi al test Leishmacheck RP.

CONCLUSIONI

Le infezioni da *Leishmania* sono caratterizzate da una forte risposta immunitaria da parte dell'ospite vertebrato nei confronti del patogeno, ragione del largo impiego di test diagnostici basati sulle tecniche immunologiche.

Sebbene le tecniche diagnostiche dirette rappresentino l'unico metodo di assoluta certezza per l'identificazione dell'infezione di *Leishmania*, l'osservazione al microscopio di strisci di aspirati linfonodali o midollari, colorati con Giemsa, può essere scarsamente sensibile¹⁸ soprattutto nel caso di animali asintomatici¹⁹ e quindi non idonea per la diagnosi di leishmaniosi canina.

La sierodiagnosi, associando alla rapidità ed alla semplicità di esecuzione, ottime prestazioni in termini di sensibilità e di specificità, può rappresentare un valido strumento diagnostico.^{15,20}

Le tecniche sierologiche sono particolarmente significative nella diagnosi di leishmaniosi canina in cui l'individuazione precoce di animali infetti può essere fondamentale nel controllo della diffusione della patologia tra cani ed all'uomo.^{21,22,23} Data la diretta correlazione tra la prevalenza di leishmaniosi canina e la trasmissione dei parassiti all'uomo,²⁴ la disponibilità di test diagnostici rapidi, non invasivi ed accurati per la realizzazione di efficienti campagne di controllo di leishmaniosi canina possono contribuire a ridurre i casi di leishmaniosi umana.²⁵

Le prestazioni delle tecniche sierologiche, quali gli ELISA, sono strettamente dipendenti dalle preparazioni di antigeni utilizzate per rivelare la presenza degli anticorpi prodotti dall'ospite vertebrato nei confronti di *Leishmania*.¹⁰ L'utilizzo di preparazioni grezze di antigeni di *Leishmania* nei test sierologici più comuni, può causare problemi di specificità a causa di cross-reazioni con altri patogeni.^{11,12} Gli antigeni crudi derivano da promastigoti coltivati in vitro e sono composti da vari antigeni somatici e componenti di superficie che sono variabili a seconda della specie di *Leishmania*. Pertanto l'utilizzo di specie o zimodemi diversi di *Leishmania* può limitare la standardizzazione del test e la riproducibilità dei risultati.¹¹

Ad oggi, sono stati caratterizzati molti antigeni di *Leishmania* che, hanno dimostrato di causare una forte risposta immunitaria umorale nel cane e che, grazie all'utilizzo delle tecnologie ricombinanti, sono stati impiegati per l'allestimento di saggi immunodiagnostici.^{6,11,12,13,26,27,28,29} In ragione dell'elevato grado di purificazione, gli antigeni ricombinanti migliorano in modo significativo la specificità

dei test diagnostici^{6,10,11,14} consentendo, inoltre una migliore standardizzazione del test rispetto al materiale derivato da colture di parassiti.⁶ L'elevata specificità è anche dovuta all'utilizzo di antigeni ricombinanti espressi nella fase amastigote del patogeno nell'ospite vertebrato, verso i quali è diretta la reazione immunitaria dell'animale.³⁰

Tuttavia, l'impiego di un singolo antigene ricombinante può risultare svantaggioso in termini di sensibilità rispetto alle preparazioni di promastigoti.³⁰

I risultati ottenuti sui 227 campioni totali, confermano che il test ELISA ricombinante Leishmacheck RP ha una specificità maggiore rispetto al test Leishmania-96 (97,0% contro 78,2%).

I valori ottenuti di sensibilità del test Leishmacheck RP sono invece leggermente inferiori a quelli del test Leishmania-96.

Come accennato in precedenza, sebbene il test IFI rappresenti il metodo di riferimento, la valutazione di campioni a basso titolo anticorpale molto vicino al cut-off (1:40 o 1:80) risulta scarsamente affidabile. I sieri con titolo IFI 1:40 vengono, pertanto, solitamente considerati dubbi, considerando ottimali le prestazioni del test IFI soltanto per titoli anticorpali > 1:160.^{5,6,31}

I risultati confermano che l'utilizzo di antigeni ricombinanti nei test ELISA può consentire un miglioramento della specificità del test, senza causare una diminuzione significativa di sensibilità. Ciò si traduce in un aumento del valore di concordanza con il test di riferimento del test Leishmacheck RP (89,0%) rispetto al Leishmania-96 (84,1%).

La strategia di unire differenti antigeni ricombinanti di *Leishmania* in un'unica proteina di fusione, applicata in un test ELISA si è dimostrata efficace, grazie alla disponibilità di un numero maggiore di determinanti antigenici per il legame con gli anticorpi presenti nel siero in esame.

Risulta inoltre vantaggioso in termini economici, di tempo e di risorse, l'utilizzo di un antigene ricombinante, espresso a partire da un'unica sequenza nucleotidica di fusione piuttosto che l'utilizzo di una miscela dei tre differenti antigeni separati che dovrebbero essere espressi, prodotti e purificati separatamente.

Parole chiave

Leishmaniosi canina, antigene ricombinante, ELISA, diagnosi, cane.

Key words

Canine leishmaniasis, recombinant antigen, ELISA, diagnosis, dog.

Bibliografia

1. Ashford R W: The leishmaniasis as emerging and re-emerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30(12-13):1269-1281, 2000.
2. Dye C, Vidor E, Deneure I: Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol. Infect.* 103:647-656, 1993.
3. Alvar J, Molina R, San Andreas M, Tesauro M et al: Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 88:371-378, 1994.
4. OIE: Leishmaniasis. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. Paris, 4th ed, 2000, pp. 803-812.
5. Mancianti F: Diagnosi sierologica di leishmaniosi canina. *Incontro SI-DEV*, Cremona, 2001, p. 3.
6. Scalone A, De Luna R, Oliva G, et al: Evaluation of the Leishmania recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.* 104:275-285, 2002.
7. Reed SG: Diagnosis of Leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* 14(5):471-478, 1996.
8. Gradoni L: Canine leishmaniasis: an update. *Hoescht Roussel Wiesbaden pp.* 32-33, 1999.
9. Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A: Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble Leishmania infantum antigen and in direct immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 59(1):13-21, 1995.
10. Singh S, Sivakumar R: Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.* 49:55-60, 2003.
11. Rosario EY, Genaro O, Franca-Silva JC, et al: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100(2): 197-203, 2005.
12. Soto M, Requena JM, Quijada L, et al: Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 36(1): 58-63, 1998.
13. Maalej IA, Chenik M, Louzir H, et al: Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified Leishmania antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68(3):312-320, 2003.
14. Badarò R, Benson D, Eulàlio MC, et al: rK-39: a cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis* 173:758-761, 1996.
15. Sundar S, Rai M: Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(5):951-958, 2002.
16. Gradoni L, Gramiccia M: Leishmaniasis. In: *OIE (ed.): Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*, Office International des Epizooties. Paris, 2000, pp. 803-812.
17. AA.VV. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Ed by OIE 5th Edition, 2004.
18. Gradoni L: The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*. Proceeding of the second international canine leishmaniasis forum. Sevilla, Spain, 2002, p. 7-14.
19. Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, et al: Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (Leishmania infantum) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73(1): 82-86, 2005.
20. Mettler M, Grimm F, Capelli G, et al: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 43(11): 5515-5519, 2005.
21. Dye C: The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55(2):125-130, 1996.
22. Ozbek Y, Turgay N, Ozensoy S, et al: Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89:89-93, 1995.
23. Tesh RB: Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52: 287-292, 1995.
24. Alvar J, Canavate C, Molina R, et al: Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 157:1-88, 2004.
25. Palatnik-de-Sousa C., Batista-Demelo M, Borja-Cabrese G, et al: Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. *An. Acad. Bras. Cienc.* 76(3):583-93, 2004.
26. Raj VS, Ghosh A, Dole VS, et al: Serodiagnosis of leishmaniasis with recombinant ORFF antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(3):482-487, 1999.
27. Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, et al: Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of Leishmania chagasi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102(2):249-61, 1999.
28. Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, et al: rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Leishmania donovani infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5(5):717-20, 1998.
29. Nieto CG, Garcia-Alonso M, Requena JM, et al: Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of Leishmania infantum: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 67(2):117-30, 1999.
30. Rosati S, Ortoffi M, Profitti M, et al: Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant Leishmania antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(6): 1153-1156, 2003.
31. Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, et al: Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of Leishmania infantum infection in dog as compared with immunofluorescence assay and western blot. *Vet. Parasitol.* 144:162-166, 2007.