

RK39 DIPSTICK TEST (LEISHMANIASIS RPYDTEST®): UN NUOVO APPROCCIO PER LA SIERODIAGNOSI DI LEISHMANIOSI CANINA

DOMENICO OTRANTO¹, PAOLA PARADIES¹, MARIATERESA SASANELLI¹
NICOLA LEONE¹, DONATO DE CAPRARIIS¹, ROSA SPINELLI², GIOIA CAPELLI³

¹Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari

²Dipartimento di Medicina Interna, Immunologia, Malattie Infettive, Facoltà di Medicina di Bari

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

Riassunto

Un test immunocromatografico rapido preparato con l'antigene ricombinante K39 (*Leishmania* rapid test; DiaSys Europe Ltd., Wokingam, UK) e già disponibile in commercio per la sierodiagnosi della leishmaniosi umana è stato validato per la sierodiagnosi di leishmaniosi canina. A tal fine sono stati utilizzati 165 sieri di cani, selezionati sulla base della positività/negatività all'esame parassitologico su puntato linfonodale, e i risultati del test sono stati comparati con quelli dell'immunofluorescenza indiretta (IFAT) (cut off 1:80). La specificità relativa del dipstick rK39 e dell'IFAT è risultata del 100% (97/97) e del 98,97% (96/97) rispettivamente, mentre la sensibilità relativa del 97,06% (66/68) e del 98,53% (67/68).

I risultati del presente studio hanno dimostrato l'utilità dell'antigene rK39 per la diagnosi di leishmaniosi canina. In particolare, il dipstick test si è dimostrato un test rapido, sensibile e specifico, utile sia per screening sierologici di massa sia nella pratica clinica poiché richiede minima attrezzatura e minima esperienza dell'operatore.

Summary

The validity of an rK39 dipstick test (Leishmania rapid test; DiaSys Europe Ltd., Wokingam, UK), commercially available for the serodiagnosis of human leishmaniasis, was evaluated using sera from 165 dogs selected on the basis of positive or negative lymph node smears at parasitological examination. The results were compared to the indirect fluorescent antibody test (IFAT) (cut-off 1:80). The relative specificity of the rK39 dipstick and IFAT was 100% (97/97) and 98.97% (96/97), while the relative sensitivity was 97.06% (66/68) and 98.53% (67/68), respectively. On the whole, the results of our study confirm the usefulness of rK39 antigen for diagnosing canine leishmaniasis both in symptomatic and asymptomatic dogs. The rK39 dipstick proved to be a rapid, sensitive, and specific test that may be very useful in the field for large scale screening and also in veterinary practice, requiring minimal equipment and operator expertise.

INTRODUZIONE

La leishmaniosi canina è particolarmente diffusa nelle aree a clima tropicale e subtropicale. In Italia la sua prevalenza varia da 1,7 a 48,4% nelle regioni centro-meridionali¹ mentre recentemente questa malattia protozoaria è stata segnalata anche in alcune regioni del settentrione.^{2,3}

La diagnosi definitiva di leishmaniosi richiede il riscontro diretto dei protozoi nelle cellule del sistema reticolo

istocitario negli strisci di tessuto (milza, midollo osseo o linfonodi)⁴ o l'amplificazione di porzioni genomiche mediante PCR.^{5,6} Gli esami sierologici hanno il vantaggio di poter identificare, con costi limitati, i soggetti asintomatici e sono di fondamentale importanza per screening di massa su ampi territori.⁷ Numerosi test sierologici per la ricerca di anticorpi anti-*Leishmania* sono stati sviluppati e fra questi l'IFAT rappresenta il gold standard per la sierodiagnosi della leishmaniosi canina.⁸

Recentemente i ricercatori hanno studiato diversi antigeni di *Leishmania* tra i quali l'antigene K39 (K39) del kinetoplasto, che è un epitopo immunodominante presente negli amastigoti tissutali di *L. infantum* (*syn. L. chagasi*) e *L. donovani* e caratterizzato da un'elevata immunogenicità.⁹

¹“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 17/1/2005 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 12/5/2005”.

L'antigene K39 è stato caratterizzato biochimicamente ed è oggi disponibile come antigene ricombinante (rK39) impiegato per fini diagnostici e in studi di immunoprofilassi. Nell'uomo, il rilievo di anticorpi circolanti anti-K39 con metodica ELISA indica uno stato di leishmaniosi attiva¹⁰ mentre nel cane indica anche forme asintomatiche di leishmaniosi.^{11,12} Un test rapido immunocromatografico basato sull'antigene rK39 (rK39 dipstick test) è stato impiegato per la diagnosi di leishmaniosi viscerale umana da *L. infantum* e *L. donovani* con una sensibilità del 67-100% e una specificità del 97-100%.^{13,14,15,16,17}

Nel cane il dipstick test rK39 è stato utilizzato da Reithinger e coll. (2002). I risultati sono stati confrontati con quelli di un test ELISA e con la PCR su buffy coat; il test ha dimostrato una sensibilità più alta di quella della PCR e comparabile con l'ELISA, ma una specificità più bassa in confronto agli altri due metodi.¹⁸

Lo scopo del presente lavoro è quello di verificare l'efficacia del dipstick rK39 test (*Leishmania* rapid test; DiaSys Europe Ltd., Wokingam, UK) per la diagnosi di leishmaniosi canina, utilizzando l'esame microscopico diretto come gold standard. I risultati del rK39 dipstick test sono stati comparati con quelli ottenuti con l'IFAT.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il numero minimo di animali da esaminare (n = 138) è stato calcolato utilizzando la formula proposta da Greiner and Gardner¹⁹ per la stima della sensibilità (Se) e della specificità (Sp) di un test, considerando un intervallo di confidenza del 95%, un margine di errore desiderato del 5% ed un valore di Se/Sp stimato a priori del 90%.²⁰

In totale sono stati selezionati 165 cani divisi in tre gruppi come segue:

Gruppo 1: 55 cani sani (controlli negativi) di cui 33 provenienti da area endemica (Puglia), senza anamnesi né segni clinici di leishmaniosi e con puntato linfonodale negativo e 22 provenienti da area non endemica (Svezia) e che non hanno mai lasciato il Paese d'origine.

Gruppo 2: 68 cani con leishmaniosi accertata tramite esame microscopico su puntato linfonodale (controlli positivi) e provenienti da area endemica (Puglia). In questi cani i sintomi più frequentemente registrati sono stati: condizioni generali scadenti, linfadenopatia periferica, dermatite esfoliativa, ulcerazioni cutanee, congiuntivite, onicogrifosi ed epistassi. Tali sintomi erano presenti in differenti combinazioni e gradi di gravità. Quattro cani di questo gruppo non presentavano segni clinici evidenti riconducibili a leishmaniosi e la positività al puntato linfonodale è stata riscontrata nel corso di indagini di routine.

Gruppo 3: 42 cani con altre patologie accertate e diverse dalla leishmaniosi di cui 24 provenienti da area endemica (Puglia), con puntato linfonodale negativo e 18 provenienti da area non endemica (Svezia). Le patologie più rappresentate erano rogna sarcopatica o demodettica, ehrlichiosi, neoplasie.

Per ciascun animale sono state raccolte informazioni riguardanti razza, sesso, età ed habitat e una anamnesi clini-

ca remota e recente; ogni cane è stato sottoposto a visita clinica accurata.

Un campione di sangue è stato prelevato dalla vena bra- chiale o dalla giugulare di ciascun cane, mantenuto a tempe- ratura ambiente e centrifugato a 3.000 giri per 10 minuti. Il siero ottenuto è stato separato e conservato alla temperatura di -20°C fino all'esecuzione degli esami sierologici.

Sui campioni di sangue prelevati dai cani provenienti da area endemica è stata eseguita l'elettroforesi delle proteine sieriche allo scopo di valutare la presenza di iperglobuline- mia e/o di un anormale rapporto albumine/globuline.

Osservazione parassitologica diretta dei puntati linfonodali

Il riscontro dei parassiti all'osservazione microscopica dei puntati linfonodali è stato utilizzato come criterio per differenziare i soggetti infetti da quelli non infetti in area endemica in quanto considerato il metodo migliore per dimostrare la presenza del parassita.²¹ Il materiale è stato prelevato per agoinfissione dai linfonodi poplitei, gli strisci colorati con MayGrunwald-Giemsa. All'osservazione al microscopio ottico, gli amastigoti (1,5-2,0 x 2,5-5 µm) contenevano un piccolo nucleo circolare ed un corto kineto- plasto bastoncellare.

Immunofluorescenza indiretta

L'immunofluorescenza è stata eseguita apportando lievi modifiche alla procedura descritta da Mancianti e Meciani²² e utilizzando come antigene promastigoti di *L. infantum* zimodema MON1, stratificati su appositi vetrini multispot. I sieri in esame, diluiti 1:80, sono stati aggiunti nei pozzetti contenenti l'antigene e i multispot sono stati messi ad incu- bare in stufa termostata per 30 min a 37°C. Dopo una se- rie di lavaggi sono stati aggiunti gli anticorpi anti-cane da coniglio marcati con fluoresceina (Rabbit anti-dog IgG; Sig- ma - Aldrich Chemie, Germany; Lot 68H9190) diluiti 1:40. I vetrini sono stati posti ad incubare nelle stesse condizioni prima descritte e, dopo ulteriori lavaggi, sono stati letti al microscopio ottico a fluorescenza a 40x.

Sono stati considerati positivi i campioni nei quali era evidente una fluorescenza a livello della membrana e/o del citoplasma dei promastigoti alla diluizione 1:80 (cut-off). Per ciascun multispot sono stati inclusi come sieri di con- trollo quelli provenienti da cani sicuramente negativi e si- curamente positivi.

Test immunocromatografico rapido (Dipstick test)

Il dipstick test è un test immunocromatografico per la determinazione di anticorpi anti-*Leishmania* su siero o plasma messo a punto per la diagnosi della leishmaniosi umana.

Sulla membrana è stratificato l'antigene rK39 a livello della linea del test e anticorpi anti-proteina A (proteina A coniugata ad oro colloidale) a livello della linea di controllo.

Il test (*Leishmania* rapid test; DiaSys Europe Ltd., Wokingam, UK) è stato eseguito secondo le indicazioni

del foglio illustrativo. Nel pozzetto-campione sono stati immessi 20 µl di siero in esame e, immediatamente dopo, 100 µl del buffer fornito con il kit; il test è stato letto dopo 10 minuti.

Sono stati considerati positivi i test in cui è stato possibile osservare due distinte linee rosse (nella regione test e nella regione controllo); negativi quelli in cui è apparsa la sola linea di controllo e non validi quelli dove non era chiaramente visibile la linea di controllo.

Valutazione del dipstick test e dell'IFAT

I due test sono stati valutati sulla base degli indici di sensibilità (Se), specificità (Sp) e likelihood ratio (LR- e LR+).¹⁹

La sensibilità è stata stabilita sui sieri di cani con leishmaniosi confermata mentre per determinare la specificità dei test sono stati impiegati i sieri dei controlli negativi provenienti da area endemica e non endemica e i sieri dei cani con altre patologie confermate, ma negativi per *Leishmania* spp.

La concordanza tra IFAT e dipstick è stata valutata tramite il calcolo del valore del "kappa" usando il software SPSS per Windows (version 12.01). Un valore kappa compreso fra 0,60-0,80 rappresenta una discreta concordanza, mentre un valore kappa >0,80 rappresenta una concordanza pressoché perfetta.²³ I campioni che hanno fornito risultati contrastanti sono stati esaminati tre volte.

Valutazioni collaterali: Dipstick test su sangue intero e prove di diluizione

Come prova collaterale è stata valutata l'attendibilità del dipstick test nel determinare la presenza di anticorpi anti-*Leishmania* anche a partire da sangue intero; a tal fine sono state effettuate tre diverse procedure su sangue di un cane positivo all'IFAT (1:20.000). In particolare sono state aggiunte tre gocce di buffer (fornito con il kit) dopo una

goccia di sangue lasciato essiccare all'aria o una goccia di sangue fresco immediatamente dopo tre gocce di buffer o tre gocce di buffer immediatamente dopo una goccia di sangue fresco.

Al fine di valutare il più basso livello di anticorpi anti-*Leishmania* svelabili dal dipstick test un siero di cane, risultato positivo all'IFAT (1:10.000), è stato testato fino alla più alta diluizione in grado di fornire un risultato positivo al test utilizzando come diluenti: a) un campione di siero sicuramente negativo perché proveniente da cane sano di area non endemica per leishmaniosi, b) acqua distillata, c) soluzione fisiologica (NaCl 0,9%).

RISULTATI

I risultati dell'IFAT e del dipstick test rK39 per la ricerca di anticorpi anti-*Leishmania* sono riportati nella Tabella 1. Nessun risultato falso positivo è stato riscontrato nel gruppo 1 (cani sani) né all'IFAT né al dipstick test. Fra i cani infetti (gruppo 2) è stato riscontrato un falso negativo all'IFAT e due falsi negativi al dipstick. Tutti i campioni del gruppo 3 sono risultati negativi al dipstick mentre un campione (proveniente da area endemica) è risultato positivo (1:80) all'IFAT.

Sia il dipstick che l'IFAT hanno mostrato ottime caratteristiche di performance: alti valori di Se e Sp, alto LR+ e basso LR- e ottima concordanza di risultati (Tabella 2). I due test infatti hanno dato risultati sovrapponibili ad eccezione di un cane (parassitologicamente positivo) risultato positivo all'IFAT (1:80 e 1:160) e negativo al dipstick test e di un cane (parassitologicamente negativo, proveniente da area endemica e con diagnosi di ehrlichiosi canina monocitica) risultato positivo all'IFAT (1:80) e negativo al dipstick test.

L'elettroforesi delle proteine sieriche ha mostrato ipergammaglobulinemia in tutti i cani del gruppo 2 ad eccezione di uno.

Fra le procedure in cui è stato impiegato sangue intero, i migliori risultati sono stati ottenuti aggiungendo tre gocce

Tabella 1
Risultati dell'IFAT (1:80) e del rK39 dipstick test per la rilevazione di anticorpi anti-*Leishmania* espressi come rapporto animali positivi/animali esaminati e percentuali

	N. positivi/totali esaminati (%)	
	IFAT	rK39 dipstick test
Gruppo 1 - Cani sani		
Area endemica	0/33 (0)	0/33 (0)
Area indenne	0/22 (0)	0/22 (0)
Totale	0/55 (0)	0/55 (0)
Gruppo 2 - Cani infetti da <i>Leishmania</i> spp.		
	67/68 (98,53)	66/68 (97,06)
Gruppo 3 - Cani con altre patologie		
Area endemica	1/24 (4,1)	0/24 (0)
Area indenne	0/18 (0)	0/18 (0)
Totale	1/42 (2,38)	0/42 (0)

Tabella 2
Performance e concordanza fra dipstick e IFAT

Test	Indici di Performance (95% CI)		Likelihood ratios		Concordanza
	Se	Sp	LR+	LR-	Kappa (95% CI)
rK39 dipstick	97,06% (93,04-100)	100% (0,01-0,11)	- (0,96-1,01)	0,03	0,987
IFAT 1:80	98,53% (95,76-100)	98,97% (96,96-100)	95,97 (13,59-671,81)	0,015 (0,002-0,104)	p=0,013

ce di buffer alla goccia di sangue lasciato essiccare all'aria. Utilizzando sangue fresco è stata possibile la lettura del test solo quando il buffer veniva immerso nel pozzetto prima del sangue.

Nella prova di diluizione, le più alte diluizioni di siero che producevano risultati positivi al dipstick test erano 1:4.000, 1:10.000 e 1: 2.000.000 quando il campione era diluito in siero negativo, acqua distillata e soluzione fisiologica rispettivamente. La soluzione fisiologica testata da sola determinava la comparsa di una linea rossa nell'area del test (la soluzione fisiologica produce falsi positivi!) mentre gli altri due diluenti testati da soli non producevano alcuna reazione nell'area del test.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio dimostrano chiaramente che l'IFAT e il dipstick test rK39 sono ugualmente accurati nello svelare la presenza di anticorpi anti-*Leishmania*.

La Se è risultata del 97,06% per il dipstick test e del 98,53% per l'IFAT (alla diluizione di 1:80 che è considerato cut-off nelle aree endemiche). Solo un cane positivo per *Leishmania* spp. (ricerca microscopica) è risultato negativo sia all'IFAT che al dipstick test. Questo cane non presentava segni evidenti di leishmaniosi e l'elettroforesi appariva normale; tali valutazioni suggerivano che l'animale si trovava in una fase iniziale della malattia. È difficile invece spiegare i risultati dei test sul siero dell'altro cane parassitologicamente positivo risultato positivo all'IFAT e negativo al dipstick.

La Sp dimostrata dall'IFAT è stata del 98,97% con un solo falso positivo per il cane appartenente al gruppo 3 con ehrlichiosi canina monocitica e proveniente da area endemica; sullo stesso campione il dipstick è risultato negativo.

Il dipstick ha mostrato una Sp del 100% e nessuna cross-reazione nei sieri degli animali del gruppo 3 provenienti sia da aree endemiche che da aree indenni. Questi risultati confermano l'alta specificità dell'antigene rK39, impiegato anche nel dipstick test, per la diagnosi differenziale della leishmaniosi umana dalla malattia di Chagas, della malaria, della schistosomiasi e della toxoplasmosi.²⁰

I risultati del presente lavoro non sono concordi con quelli di Reithinger e coll.¹⁸ che, in uno studio volto a valutare lo stesso test per la diagnosi di leishmaniosi canina, riportano bassi valori di specificità per il dipstick (61% e 75% in confronto con PCR e ELISA rispettivamente) dichiarando un elevato numero di falsi positivi. La Se del di-

pstick riportata da Reithinger et al.¹⁸ è risultata del 72% e 77% in confronto alla PCR e all'ELISA rispettivamente mentre nel presente lavoro è risultata pari al 97,06%.

Le discrepanze tra i risultati del presente lavoro e quelli di Reithinger e coll.¹⁸ possono essere dovute all'uso di un differente approccio per stimare la popolazione dei falsi positivi e dei falsi negativi. Infatti, mentre Reithinger e coll.¹⁸ non hanno effettuato alcuna ricerca microscopica del parassita e i cani positivi o negativi sono stati selezionati sulla base della positività/negatività all'ELISA e/o PCR, nel presente studio il criterio per la selezione dei cani positivi e negativi è stato basato sulla positività o negatività all'esame parassitologico diretto su strisci da puntato linfonodale. In effetti, sebbene l'utilizzo di tecniche biomolecolari offra molti vantaggi, le metodiche basate sulla PCR sono caratterizzate da una bassa specificità (possono infatti fornire risultati positivi anche in presenza di materiale genomico inerte) e una minore sensibilità nell'identificare l'infezione nei cani asintomatici o in animali in follow-up post-trattamento.^{24,25}

I risultati di questo lavoro confermano quelli riportati da Sundar et al.,¹⁶ Jelinek et al.,¹⁵ Bern et al.,¹³ Zijlstra et al.¹⁷ e Brandonisio et al.,¹⁴ i quali hanno utilizzato questo dipstick test per la diagnosi di leishmaniosi viscerale umana registrando una specificità variabile dal 97 al 100%.

Per concludere, il dipstick test e l'IFAT hanno mostrato entrambi buona sensibilità e specificità. L'IFAT ha il vantaggio di essere un test sia qualitativo che quantitativo; tuttavia la corretta interpretazione dei risultati di questo test può dipendere da diverse variabili tra cui la modalità di esecuzione e l'esperienza dell'operatore, mentre per il dipstick la comparsa di una linea, seppur di differente intensità (da rossa a rosa) è un segno inequivocabile di positività.

Per ciò che concerne l'uso del dipstick a partire da sangue intero, il miglior risultato è stato ottenuto lasciando essiccare la goccia di sangue nel pozzetto prima di aggiungere le tre gocce di buffer. La tecnica era stata già utilizzata con successo nella diagnosi di leishmaniosi viscerale umana in condizioni di campo in India.¹⁶

Sebbene il dipstick non sia un test quantitativo la prova di diluizione eseguita ha dimostrato che un campione positivo all'IFAT (1:10.000) è positivo fino a diluizioni di 1:4.000 e 1:10.000 quando diluito in siero negativo e in acqua distillata rispettivamente e ciò fa ipotizzare che il test sia in grado di svelare la presenza di quantità anche minime di anticorpi; la soluzione fisiologica invece induce da sola la comparsa di una linea rosa nell'area del test produ-

cendo falsi positivi. Questo è un riscontro di grande importanza se si considera che in condizioni di campo con temperature superiori ai 40 °C e bassa umidità relativa può essere necessario diluire il siero prima di eseguire il test. In uno studio sul dipstick test condotto in Sudan¹⁷ la diluizione dei campioni di siero in soluzione fisiologica ha infatti causato risultati falsi positivi probabilmente a causa dell'aggiunta di un diluente improprio.

In conclusione il dipstick può rappresentare una valida alternativa ai test diagnostici sierologici attualmente disponibili con un ottimo rapporto costo-beneficio specialmente quando usato per indagini sierologiche su larga scala che non richiedono determinazione del titolo anticorpale. Il dipstick test rK39 è anche ideale quando si deve effettuare diagnosi di leishmaniosi canina in condizioni di campo per diversi motivi: può essere letto facilmente; non richiede equipaggiamenti particolari né elettricità né refrigerazione; può essere utilizzato il sangue intero da testare anche in seguito; il training necessario per imparare a leggere il dipstick è minimo se comparato alla diagnosi microscopica, all'ELISA, IFAT e PCR; infine la possibilità di visualizzare immediatamente i risultati e comunicarli ai proprietari in tempo reale rende questo test utile anche nella conferma di sospetto diagnostico di leishmaniosi canina nella pratica clinica veterinaria. Non va comunque dimenticato che nelle aree endemiche un test sierologico positivo può essere riscontrato oltre che in animali infetti o malati, anche in animali in via di guarigione o guariti, e dunque, come per tutti gli altri test sierologici, i risultati del test devono essere valutati attentamente nel contesto epidemiologico da cui proviene il campione e in base all'obbiettivo dell'indagine per cui viene effettuato il test.

Test diagnostici rapidi, sensibili e specifici quale si è dimostrato il dipstick rK39 in questo studio sono particolarmente utili ed estremamente pratici nelle campagne di intervento volte a definire la diffusione della leishmaniosi canina e conseguentemente a stabilire una profilassi contro i flebotomi vettori con lo scopo finale di ridurre l'incidenza della leishmaniosi umana e canina.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare i Dr. J. Chirico, L. Gunnarson, G. Zakrisson e E. Týsen (Department of Parasitology [SWEPAR], National Veterinary Institute, Uppsala, Svezia) per i campioni di siero provenienti da aree non endemiche e negativi per Leishmania.

Parole chiave

Leishmania infantum, leishmaniosi, cane, rK39, test rapido, sierodiagnosi.

Key words

Leishmania infantum, leishmaniasis, dog, rK39, rapid test, serodiagnosis.

Bibliografia

1. Gradoni L: The Diagnosis of Canine Leishmaniasis. 2nd International Canine Leishmaniasis International Forum, Sevilla (Spain), ed. Inter-vet bv, 2002, pp 7-14.
2. Baldelli R, Battelli G, Maroli M et al: A New Stable Focus of Canine Leishmaniasis in Northern Italy. *Parassitologia* 43 (4): 151-153, 2002.
3. Capelli G, Natale A, Frangipane di Regalbono A et al: Serological and Entomological Surveillance of a New Autochthonous Focus of Canine Leishmaniasis in north-eastern Italy. 19th International Conference of the World Association for the Advancement in Veterinary Parasitology, New Orleans, 2003, p 92.
4. Herwaldt BL: Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199, 1999.
5. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P et al: Comparison of Various Sample Preparation Methods for PCR Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood. *J. Clin. Microbiol.* 39: 613-617, 2001.
6. Lachaud L, Marchegui-Hammami S, Chabbert E, et al.: Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40:210-225, 2002.
7. Badarò R, Jones TC, Carvalho EM et al: New Perspective on a Subclinical Form of Visceral Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 15: 1003-1011, 1986.
8. OIE: 2000, Leishmaniosis. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccine, 4th ed., pp. 803-812, Office International des Epizooties, Paris, France.
9. Burns JMJr, Shreffler WG, Benson DR et al: Molecular Characterization of a Kinesin-related Antigen of *Leishmania chagasi* that Detects Specific Antibody in African and American Visceral Leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 775-779, 1993.
10. Badarò R, Benson D, Eulálio MC et al: rK39: a Cloned Antigen of *L. chagasi* that Predicts Active Visceral Leishmaniasis (VL). *J. Infect. Dis.* 173: 758-761, 1996.
11. Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N et al: Immune Responses Against *Leishmania* Antigens in Dogs Naturally and Experimentally Infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 82: 173-184, 1999.
12. 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.
13. Bern C, Jha SN, Joshi AB et al.: Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 63:153-157, 2000.
14. Brandonisio O, Fumarola L, Maggi P et al: Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Test for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 21: 461-464, 2002.
15. Jelinek T, Eichnlaub S, Löscher T: Sensitivity and Specificity of a Rapid Immunochromatographic Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 669-670, 1999.
16. Sundar S, Reed SG, Singh VP et al: Rapid Accurate Field Diagnosis of Indian Visceral Leishmaniasis. *Lancet* 351: 563-565, 1998.
17. Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P et al: Diagnosing Visceral Leishmaniasis with the Recombinant K39 Strip Test: Experience from the Sudan. *Trop. Med. Int. Health* 6: 108-113, 2001.
18. Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR: Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-linked Immunosorbent Assay and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2352-2356, 2002.
19. Greiner M, Gardner IA: Epidemiologic Issues in the Validation of Veterinary Diagnostic Tests. *Prev. Vet. Med.* 45 (1-2): 3-22, 2000.
20. Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V et al: Value of a Dipstick Test Based on Recombinant RK39 Antigen for Differential Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis from Other Sympatric Endemic Disease in Venezuela. *Parasite* 8: 355-387, 2001.
21. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S: Leishmaniasis: New Approaches to Disease Control. *British Medical Journal* 326: 377-382, 2003.
22. Mancianti F, Meciani N: Specific Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis by Indirect Immunofluorescence, Indirect Haemoagglutination and Counterimmunoelectrophoresis. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1409-1411, 1988.
23. Altman DG: *Practical Statistics for Medical Research*. London, Chapman & Hall, 1991, p 611.
24. Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S et al: Detection of *Leishmania infantum* by PCR, Serology and Immune Response in a Cohort Study of Brazilian Dogs. *Parasitology* 122: 253-261, 2001.
25. Reithinger R, Espinoza JC, Courtenay O, Davies CR: 2003, Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania* (Viannia) spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J Clin Microbiol* 41:1486-1493.