

KOIRAN LEISHMANIOOSI – kirjallisuuskatsaus

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

ELK Heini Gröning

Helsingin yliopisto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto

Pieneläinten sisätautioppi

2018



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare - Author Heini Gröning			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Koiran leishmanioosi - kirjallisuuskatsaus			
Oppiaine - Läroämne - Subject Pieneläinten sisätautioppi			
Työn laji - Arbetets art - Level Kirjallisuuskatsaus		Aika - Datum - Month and year Marraskuu 2018	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 60
<p>Tiivistelmä - Referat – Abstract</p> <p>Tämän kirjallisuuskatsauksen tavoite on koota yhteen ajantasainen tutkimustieto koiran leishmanioosista eläinlääkäreiden käyttöön. Lemmikien lisääntyneen matkustelun ja tuontikoirien myötä myös trooppiset sairaudet, kuten leishmanioosi ovat lisääntyneet koirilla Suomessa. Kirjallisuuskatsaus auttaa myös matkustavien koirien tartunnan ehkäisyn suunnittelussa, taudin diagnostiikassa sekä kliinisesti sairaan koiran hoidossa.</p> <p>Koiran leishmanioosi on Leishmania-suvun alkueläinten aiheuttama vektorivälitteinen sairaus, jota esiintyy endeemisenä muun muassa Etelä-Euroopassa. Etelä-Euroopassa taudin aiheuttaa <i>Leishmania infantum</i>, jonka vektorina toimivat Phlebotomus-suvun hietasääsket.</p> <p>Koiralla leishmanioosin taudinkuva vaihtelee subkliinisestä oireettomasta vakavaoireiseen kliiniseen leishmanioosiin. Taudin itämisaika voi olla jopa seitsemän vuotta. Tyypillisiä oireita ovat erilaiset ihovauriot, kuten ihotulehdukset, haavaumat, karvattomuus ja ihon sarveistuminen. Tyypilliset yleisoireet ovat laihtuminen, heikkous, suurentuneet imusolmukkeet, ontuminen, nenäverenvuoto, verivirtsaisuus ja kuume. Kliinisesti oireilevalla koiralla on korostunut humoraalinen immuunivaste, joka voi johtaa immuunikompleksien muodostumiseen ja niiden varastoitumiseen eri kudoksiin. Tämä voi aiheuttaa munuaiskeräsaurioita, vaskuliittia sekä silmä-, lihas- ja moniniveltulehduksia. Tyypillisiä laboratoriolöydöksiä kliinisesti sairailta koirilla ovat anemia, hyperglobulinemia, hypoalbuminemia ja verihiutalekato. Koirilla havaitaan yleensä akuutin faasin proteiinin, kuten C-reaktiivisen proteiinin (CRP) nousu. Koska kliininen leishmanioosi vaikuttaa useisiin elimiin, havaitaan koirilla usein myös muutoksia elinarvoissa.</p> <p>Koiran leishmanioosin diagnostiikka perustuu sairauteen sopiviin kliinisiin oireisiin ja löydöksiin sekä tartunnan ja/tai Leishmania-spesifisten vasta-aineiden osoittamiseen. Koiran ennusteeseen vaikuttaa oireiden vakavuus ja varsinkin heikentynyt munuaisten toiminta huonontaa ennustetta. Tämän vuoksi sairauden varhainen diagnosointi on tärkeää.</p> <p>Kliinisen leishmanioosin hoidossa käytetään yleisimmin allopurinolia yhdistettynä miltefosiiniin tai meglumiiniantimoniaattiin. Pitkäaikaislääkityksenä käytetään yleensä pelkkää allopurinolia. Lääkityksillä voidaan saavuttaa koiran kliininen paraneminen, mutta täydellinen parasitologinen paraneminen saavutetaan vain harvoin, joten taudin uudelleenpuhkeaminen on mahdollista. Lääkityksen aloittamisen jälkeen on tärkeää kontrolloida koiran veri- ja virtsanäyte sekä seerumin vasta-ainetasot säännöllisesti. Myös terveiltä, endeemisillä alueilla olleilta koirilta on suositeltavaa tutkia seerumin vasta-ainetasot 6–12 kuukauden välein, jotta mahdollisesti puhkeava leishmanioosi voidaan havaita ajoissa.</p> <p>Koska koira saa yleisimmin tartunnan infektoituneen hietasääskien piston yhteydessä, perustuu tartunnan ehkäisy endeemisillä alueilla hietasääskien ehkäisyyn erilaisilla ulkoloisvalmisteilla. Lisäksi koira tulisi pitää sisätiloissa hietasääskien aktiivisimpaan aikaan eli iltaisin ja öisin. Tartunnan ehkäisyn apuna voidaan myös käyttää rokotteita ja koiran soluvälitteistä immuunivastetta parantavaa domperidoni-lääkitystä.</p> <p>Tulevaisuudessa olisi toivottavaa, että sekä lääkitys että tartunnan ehkäisyyn käytettävät valmisteet kehittyisivät, jolloin voitaisiin kokonaisvaltaisesti ehkäistä tartuntoja. Pelkästään eläimille käytettävien lääkeaineiden kehittäminen olisi tärkeää, jotta loiset eivät kehittäisi resistenssiä ihmisten leishmaniaasin hoitoon käytetyille lääkkeille.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords leishmanioosi, leishmaniaasi, <i>Leishmania infantum</i> , koira			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) Thomas Spillmann Henna Laurila Sanna Viitanen			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	2
2.1 Leishmania infantum taudinaiheuttajana	2
2.1.1 Tartuntatavat koirilla	3
2.1.2 Levinneisyys.....	5
2.1.3 Riskitekijät	6
2.1.4 Immunologiset reaktiot Leishmania-tartunnoissa	7
2.2 Kliiniset oireet ja löydökset	8
2.2.1 Kliiniset oireet.....	8
2.2.2 Laboratoriolöydökset	9
2.3 Diagnostiikka	10
2.3.1 Parasitologiset testit.....	13
2.3.1.1 Sytologia	13
2.3.1.2 Histologinen tutkimus	16
2.3.1.3 Immunohistokemiallinen tutkimus	18
2.3.1.4 Viljely	19
2.3.1.5 Ksenodiagnostiikka.....	19
2.3.2 Molekyylibiologiset testit	20
2.3.2.1 Polymeraasiketjureaktio (PCR).....	20
2.3.3 Serologiset testit.....	21
2.3.3.1 Kvantitatiiviset testit (IFAT ja ELISA)	22
2.3.3.2 Kvalitatiiviset testit (pikatestit)	24
2.4 Lääkehoito	26
2.4.1 Allopurinoli	26
2.4.2 Miltefosiini.....	28
2.4.3 Meglumiiniantimoniaatti.....	28
2.4.4 Muita leishmanioosin hoidossa käytettäviä lääkkeitä	29
2.4.4.1 Domperidoni	29
2.4.4.2 Amfoterisiini B.....	30
2.5 Luokittelu ja ennuste	31
2.5.1 LeishVet-luokittelu	32
2.5.2 CLWG-luokittelu	33
2.6 Sairauden seuranta	35
2.6.1 Terve koira	35
2.6.2 Sairas koira	35
2.7 Tartunnan ehkäisy	36
2.7.1 Ulkoloislääkkeet	36
2.7.1.1 Lääkepannat	37
2.7.1.2 Paikallisvaleluliukset	38
2.7.2 Rokotteet	40
2.7.3 Domperidoni.....	41
3 POHDINTA	42
4 LÄHDELUETTELO	46

1 JOHDANTO

Koiran leishmanioosi on vektorivälitteinen sairaus, jonka aiheuttaa *Leishmania*-suvun alkueläimet, tärkeimpänä *Leishmania infantum*. Euroopassa *L. infantum* vektorina toimii *Phlebotomus*-suvun hietasääsket (ESCCAP 2012). Koiran leishmanioosia esiintyy endeemisenä Etelä-Euroopassa, Etelä- ja Keski-Amerikassa, Afrikassa sekä Aasiassa. Lisääntyneen matkustelun ja koirien maahantuonnin seurauksena tautia tavataan myös ei-endeemisillä alueilla (Solano-Gallego ym. 2011).

Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen eläintautien ilmoittamisesta ja mikrobikantojen toimittamisesta (MMM 1010/2013 9§) mukaan koiran leishmanioosi kuuluu Suomessa aluehallintovirastolle ilmoitettaviin eläintauteihin. Eläinlääkärin on ilmoitettava leishmanioositartunnoista kunnaneläinlääkärille tai aluehallintovirastolle viipymättä (Eläintautilaki 441/2013 15§). Kunnaneläinlääkäri ilmoittaa kuukausittain toteamistaan tartunnoista ja vastaanottamistaan ilmoituksista aluehallintovirastolle ja aluehallintovirasto Elintarviketurvallisuusvirastolle (Eläintautilaki 441/2013 16§).

Tässä kirjallisuuskatsauksessa esitellään *Leishmania infantum* taudinaiheuttajana ja lisäksi käydään läpi taudin levinneisyyttä ja tekijöitä, jotka voivat lisätä riskiä tartunnalle. Työn tarkoitus on koota yhteen tämän hetken tietoa koiran leishmanioosin tartuntatavoista, diagnostiikasta, oireista ja löydöksistä, ennaltaehkäisystä, hoitovaihtoehtoista ja ennusteesta.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 *Leishmania infantum* taudinaiheuttajana

Leishmanioosi on zoonoosi ja koira on pidetty *L. infantum*in tärkeimpänä reservuaarina, mutta viime vuosina myös villieläinten, kuten jänisten ja villien koira-eläinten on todettu ylläpitävän ihmistartuntoja (Miró ym. 2017). Ihmisten sairaudesta puhuttaessa käytetään yleensä termiä leishmaniaasi, kun taas koirien tapauksissa terminä on leishmanioosi. Ihminen saa tartunnan yleensä vektorivälitteisesti infektoituneen hietasääsken piston välityksellä (Miró ja López-Vélez 2018). Ilman vektoria tartunta voi siirtyä *Leishmania*-tartunnan saaneesta ihmisestä toiseen henkilöön verensiirron välityksellä käytettäessä koko verta (Dey ja Singh 2006), elinsiirroissa (Boucekoua ym. 2014) tai suonensisäisiä huumeita käyttävillä jaettujen ruiskujen kautta (Cruz ym. 2002). Harvinaisissa tapauksissa tartunta voi myös siirtyä vertikaalisesti tartunnan saaneelta äidiltä lapselle raskauden aikana (Meinecke ym. 1999). Tartunta verensiirron välityksellä on nykyään lähes teoreettinen, sillä käytettävä veri käsitellään menetelmillä, jotka tuhoavat taudinaiheuttajat (Miró ja López-Vélez 2018). Kirjallisuudessa ei löydy yhtään julkaisua koirasta suoraan ihmiseen tapahtuneesta tartunnasta, eikä leishmanioosia sairastavan koiran ole todettu lisäävän ihmisten riskiä sairastua leishmaniaasiin. Myöskään tartunta leishmanioosia sairastavasta koirasta ihmiseen neulanpiston välityksellä on ainoastaan teoriassa mahdollinen, sillä neulan kautta mahdollisesti siirtyvä amastigoottien määrä ei ole riittävä aiheuttamaan tartuntaa (López-Vélez, suullinen tiedonanto 10/2018).

Ihmisillä kliininen leishmaniaasi voi olla joko ihoon vaurioita aiheuttavaa kutaanista muotoa, ihoa ja limakalvoja vaurioittavaa mukokutaanista muotoa tai eri elimiä vaurioittavaa viskeraalista muotoa (OIE 2018). Muoto riippuu tartunnan aiheuttaneesta *Leishmania*-lajista ja kannasta: viskeraalisen muodon aiheuttaa Euroopassa *L. infantum* ja sitä tavataan eniten lapsilla ja immuunivajeesta kärsivillä henkilöillä. Immuunivajalla henkilöillä voi esiintyä myös kliinisen leishmaniaasin yleistynyttä muotoa, jolloin potilaalla on sekä iho- että elinvaurioita (van Griensven ja Diro 2012, Miró ja López-Vélez 2018). Koirien leishmanioosi on taas lähes aina yleistynyttä muotoa (Koutinas ym. 1999). Hoitamattomana viskeraalinen leishmaniaasi

johtaa usein ihmisen kuolemaan, mutta toisin kuin koirien tapauksessa, lääkehoidolla voidaan yleensä saavuttaa täydellinen paraneminen (van Griensven ja Diro 2012, Miró ja López-Vélez 2018). Paranemisen jälkeen ihmiselle syntyy todennäköisesti suojaava immuniteetti uutta tartuntaa vastaan (van Griensven ja Diro 2012). Immuunivajailta henkilöillä paranemisprosentti on pienempi ja taudin uudelleenpuhkeaminen todennäköisempää. Ihmisen kutaaninen leishmaniaasi paranee yleensä spontaanisti ilman hoitoa (Miró ja López-Vélez 2018).

2.1.1 Tartuntatavat koirilla

Leishmania-loisen tärkein tartuntatapa on vektorivälitteinen tartunta hietasääsken välityksellä. Muita tutkimuksissa todistettuja tartuntatapoja ovat tartunta verensiirron kautta, veneraalinen tartunta urokselta nartulle sekä vertikaalinen tartunta emolta pennuille. On myös epäilty, että tartunta saattaa tapahtua muiden vertaimevien niveljalkaisten, kuten kissan kirpun (*Ctenocephalides felis*) ja ruskean koirapunkin (*Rhipicephalus sanguineus*) välityksellä sekä suoraan koirasta toiseen verikontaktin kautta (Baneth ym. 2008).

Euroopassa *Leishmania infantum* -loisen luonnollinen tartunta tapahtuu naaraspuolisen Phlebotomus-lajin hietasääsken välityksellä. Leishmania-loisen elinkiertoon kuuluu infektoituneen nisäkäsissan makrofageissa elävät solunsisäiset amastigoottimuodot sekä hietasääsken ruoansulatuskanavan solunulkoiset promastigoottimuodot (Bates 2007). Leishmania-loisen kehitys hietasääskessä amastigootista infektiiviseksi promastigootiksi kestää 7–14 vuorokautta ja vaatii vähintään 18 °C:n lämpötilan (ESCCAP 2012). Hietasääski aiheuttaa kudostuhoa imiessään verta nisäkkäästä, jonka seurauksena infektoituneita makrofageja pääsee veriaterian mukana hietasääsken suolistoon. Amastigootit aloittavat kypsymisensä hietasääsken keskisuolen takaosassa, jossa ne läpikäyvät morfologisia muutoksia. Tämän jälkeen ne vaeltavat keskisuolen etuosaan ja kertyvät etu- ja keskisuolen liitoskohtaan. Lopulta osa kehittyy nisäkkäille infektiivisiksi promastigootteiksi, jotka voivat siirtyä hietasääsken ruokaillessa uuteen nisäkäsistäntään (Bates 2007). Hietasääski ruiskuttaa promastigootit isäntäeläimen ihoon, josta isännän syöjäsolut, kuten neutrofiilit, dendriittisolut ja makrofagit, syövät ne. Makrofageissa tapahtuu promastigoottien

erilaistuminen amastigootteiksi, jotka ovat jakautumiskykyisiä. Kun jakautumisia on tapahtunut tarpeeksi, isäntäsolu repeää ja vapautuneet amastigootit voivat infektoida uusia syöjäsoluja (Hosein ym. 2017). Hietasääski voi saada tartunnan imiessään infektoituneen koiran verta. Sairauden lievässä vaiheessa koiran ihon parasiittimäärä on pieni sekä normaalin näköisessä, että vaurioituneessa ihosta, joten koiran infektiivisyys hietasääskelle riippuu taudin vakavuusasteesta (Ordeix ym. 2017).

Ihmisten tavoin myös koirilla *Leishmania*-loisen vertikaalinen tartunta istukan kautta emolta pennulle on mahdollinen (Rosypal ym. 2005). Tartunta voi tapahtua, vaikka emo olisi tiineyden hetkellä oireeton (Kegler Pangrazio ym. 2009). Vertikaalisesti tartunnan saaneet pennut voivat myös levittää tartuntaa edelleen hietasääskiin (Slimane ym. 2014). Tutkimuksissa on saatu kuitenkin viitteitä, että tartunnan saaneilla nartuilla tiinehtyminen ja tiineyden ylläpito ovat heikompaa kuin terveillä koirilla (Rosypal ym. 2005).

Leishmania-loisen on todettu voivan tarttua veneraalisesti astutuksen yhteydessä infektoituneelta urokselta nartulle (Silva ym. 2009). Tartunnan saaneilla uroksilla voi olla amastigootteja sisältäviä tulehdusmuutoksia sukupuolielimissä, etenkin kiveksissä, lisäkiveksissä, esinahassa ja siittimen päässä (Diniz ym. 2005). Amastigootteja ei kuitenkaan välttämättä erity siemennesteeseen jokaisen siemensyöksyn yhteydessä, vaan erityis on ajoittaista. Nartuilla vastaavia amastigootteja sisältäviä sukupuolielinalueen tulehdusmuutoksia ei ole havaittu (Silva ym. 2009).

Leishmania-tartunta on mahdollista saada verensiirron kautta, mikäli verenluovuttajana on tartunnan saanut koira. Tartunta on mahdollinen siirrettäessä suodattamattomia punasoluja, jolloin mukana saattaa olla myös infektoituneita makrofageja. Tartunnan ei ole tutkimuksissa havaittu tarttuvan plasmansiirron välityksellä (Owens ym. 2001).

Leishmania-tartunnan on epäilty olevan mahdollinen myös muiden vertaimevien niveljalakaisten kuin hietasääsken välityksellä. Tartunta on saatu kokeellisesti siirrettyä koirasta hamsteriin ruskean koirapunkin (Coutinho ym. 2005) ja kissan kirpun välityksellä (Coutinho ja Linardi 2007).

Koiran leishmanioosia on tavattu kotoperäisinä tartuntoina alueilla, joilla ei tiettävästi esiinny sopivaa hietasääskivektoria, minkä johdosta taudin on epäilty voivan tarttua suoraan koirasta toiseen. Kotoperäisiä tartuntoja on havaittu Suomessa, Saksassa ja Uudessa-Kaledoniassa (Naucke ym. 2016). Suomessa raportoidussa tartunnassa Espanjassa puoli vuotta vierailut urosbokseri tartutti Suomeen palattuaan *Leishmania-loisen* toiseen suomalaiseseen urokseen todennäköisesti tappeluhaavojen välityksellä ja suomalaisen narttuun joko parittelun tai tappeluhaavojen välityksellä. Koirat sairastuivat kliiniseen leishmanioosiin ja ne lopetettiin (Karkamo ym. 2014). Karkamo ym. (2014) spekuloi, että jos koira voi saada toiselta koiralta *Leishmania*-tartunnan veri-verikontaktissa haavojen kautta, tartunnan voisi koiran puremasta saada mahdollisesti myös ihminen.

2.1.2 Levinneisyys

Koiran leishmanioosia esiintyy endeemisenä yli 70 maassa ja myös ei-endeemisillä alueilla tuontikoirien ja lisääntyneen matkustelun seurauksena (Solano-Gallego ym. 2011). Leishmanioosin endeemiset alueet ovat alueita, joilla esiintyy *Leishmania-loiselle* sopivia hietasääskiä. Hietasääsket vaativat selviytyäkseen ja lisääntyäkseen lämpimät elinolosuhteet ja sopivan ilmankosteuden. Tärkeimpiä hietasääsken leviämiseen vaikuttavia tekijöitä ovat talvi- ja kesäkuukausien lämpötilat sekä lämpötilan vuodenaikaisvaihtelu (Koch ym. 2017). Hietasääsken kehitys munasta aikuiseksi kestää 30–100 vuorokautta ja munien kehitys vaatii yli 15 °C:n lämpötilan (Taylor ym. 2007). Hietasääsken kylmänsietokyky vaihtelee lajeittain ja lisäksi kehitys on hitaampaa kylmemmissä olosuhteissa. (Kasap ja Alten 2005). Esimerkiksi *Phlebotomus papatasi* -lajin aikuiset naaraat eivät selviydy alle 15 °C:n lämpötilassa pitkiä aikoja (Kasap ja Alten 2006) ja nopeinta kehitys munasta aikuiseksi tällä lajilla on 32 °C:n lämpötilassa (Kasap ja Alten 2005). *Phlebotomus papatasi* -lajin toukat voivat selvitä hengissä muutaman päivän lämpötilassa 0 °C, kun taas *Phlebotomus perniciosus* -lajin toukat kuolevat lämpötilan ollessa 2–10 °C. Munien selviytymisen kannalta riittävä kosteus on tärkeä tekijä (Kasap ja Alten 2005). Yleisesti ottaen hietasääskiä tavataan alueilla, joilla lämpötila pysyy usean kuukauden ajan yli 15,6 °C:ssa. Lisäksi hietasääskien selviytymiseen vaikuttaa maaperän tyyppi, ympäristö sekä sade- ja tuuliolosuhteet. Tällä hetkellä Euroopassa lähinnä Välimeren

maissa on hietasääskille sopivat elinolosuhteet, mutta ilmaston lämpenemisen myötä hietasääsket voivat mahdollisesti levitä Keski- ja Pohjois-Eurooppaan (Koch ym. 2017).

2.1.3 Riskitekijät

Koiran geneettinen tausta, immuunivaste ja samanaikaiset muut sairaudet sekä parasiitin taudinaiheuttamiskyky määrittelevät *Leishmania*-tartunnan lopputuloksen (Hosein ym. 2017). Herkillä koirilla voi olla geneettinen alttius sairastua tai herkkyys voi olla hankittua, jolloin altistavana tekijänä voi olla koiran korkea ikä (Quinnell ym. 2003) tai samanaikaiset muut vastustuskykyä heikentävät sairaudet (Cringoli ym. 2002). Tutkimuksessaan Miranda ym. (2008) tutkivat koirien sukupuolen, iän ja rodun vaikutusta herkkyyteen sairastua leishmanioosiin. Tutkimuksessa todettiin tutkittavassa ryhmässä (390 koiraa, joita hoidettiin leishmanioosin vuoksi) sairastuneista olevan 61 % uroksia ja 39 % narttuja kun taas verrokkiryhmässä (12 159 koiraa, jotka olivat käyneet samassa sairaalassa muun syyn vuoksi) koirista 53 % oli uroksia ja 47 % narttuja (Miranda ym. 2008). Koiran sukupuolella ei kuitenkaan todennäköisesti ole vaikutusta sairastumisriskiin (Quinnell ym. 2003, Miranda ym. 2008, Gálvez ym. 2010, Cortes ym. 2012) Sairastuneiden koirien ikäjakauman on todettu olevan kaksihuippuinen (Miranda ym. 2008, Gálvez ym. 2010). Miranda ym. (2008) totesivat tutkimuksessaan, että leishmanioosia esiintyi eniten 2–4-vuotiailla koirilla ja yli 7-vuotiailla koirilla. Sairastuneissa koirissa verrokkiryhmään verrattuna eniten edustetut rodut olivat saksanpaimenkoira (13,6 %), rottweiler (13,1 %) ja bokseri (7,9 %). Sairastuneissa koirissa verrokkiryhmään verrattuna vähiten sairastuneita rotuja olivat yorkshirenterrieri (0,5 %) ja villakoira (0,3 %). Verrokkiryhmässä saksanpaimenkoiria oli 6,4 %, rottweilereita 3,0 %, boksereita 4,7 %, yorkshirenterriereitä 6,5 % ja villakoiria 3,0 % (Miranda ym. 2008). Samanlaisia viitteitä rodun ja iän vaikutuksesta herkkyyteen sairastua leishmanioosiin on saatu myös muissa tutkimuksissa (Solano-Gallego ym. 2011). Koirat, jotka asuvat pääasiassa tai täysin ulkotiloissa sekä koirat, joilla ei käytetä säännöllistä ulkoloishäätöä ovat myös suuremmassa riskissä saada tartunta (Gálvez ym. 2010, Cortes ym. 2012). Myös lyhytkarvaisuus (Cortes ym. 2012) ja koiran suuri koko saattavat lisätä tartuntariskiä (Gálvez ym. 2010).

2.1.4 Immunologiset reaktiot Leishmania-tartunnoissa

Leishmania-promastigootit siirtyvät hietasääsken ruokailun yhteydessä isäntäeläimen ihon verinahkaan, jonka jälkeen niiden on vältettävä isäntäeläimen luontainen immunitetti ennen kiinnittymistä makrofagien komplementtiresptoriin ja siirtymistä makrofagien sisälle (Ferrer 2002). Makrofageja pidetään Leishmania-loisten pääisäntäsoluina, sillä niissä tapahtuu promastigoottien kehitys amastigootteiksi sekä lisääntyminen (Ferrer 2002). Leishmania-loiset voivat kuitenkin infektoida myös monia muita elimistön solutyyppejä ja näin tunkeutua lähes kaikkiin kudoksiin (González ym. 1988, Tafuri ym. 2001, Viñuelas ym. 2001, Ferrer 2002, Levy ym. 2006). Leishmanioosille herkällä koiralla makrofagit voivat kuljettaa amastigootit laajasti elimistöön jo tunneissa, kun taas resistenteilla koirilla amastigootteja sisältävät makrofagit pysyvät yleensä paikallisissa imusolmukkeissa ja iholla (Ferrer 2002).

Luonnollisesti resistenteilla koirilla kehittyä tehokas spesifinen T-soluvälitteinen immuunivaste Leishmania-loista vastaan (Rodríguez-Cortés ym. 2007). Tämä vaste johtaa immunologiseen resistenssiin ja näin suojaa koiria tartunnalta. Koska luonnonvalinta suosii resistentejä genotyyppejä, on endeemisten alueiden paikallisten rotujen yksilöillä usein tehokas suojaava soluvälitteinen immuunivaste. Tästä syystä tiettyjä rotuja, kuten ibizanpodenco, voidaan pitää resistentimpinä kliiniselle leishmanioosille (Solano-Gallego ym. 2000). Resistenteilla koirilla havaittuun voimakkaaseen tyyppin 1 auttaja-T-solujen aktivaatioon (Th1-soluaktivaatioon) liittyy muun muassa interleukiini-2:n ja gamma-interferonin tuotanto (Rodríguez-Cortés ym. 2007). Tämä tehokas soluvälitteinen immunitetti tuhoaa solunsisäiset amastigootit aktivoituneiden makrofagien tuottaman typpioksidin välityksellä (Holzmüller ym. 2005). Herkillä koirilla taas on liioiteltu tyyppin 2 auttaja-T-soluvälitteinen (Th2-välitteinen) humoraalinen ja puutteellinen Th1-soluvälitteinen immuunivaste (Rodríguez-Cortés ym. 2007). Puutteellinen solunsisäinen amastigoottien tuhoaminen johtaa loisen rajattomaan lisääntymiseen (Sanchez ym. 2004), B-lymfosyyttien aktivaatioon ja vasta-aineiden ylituotantoon (Martinez-Moreno ym. 1993, Rodríguez-Cortés ym. 2007, Alexandre-Pires ym. 2010). Leishmania-tartunnan saaneiden koirien seerumista on eristetty leishmaniaspesifistä vasta-aineista ainakin immunoglobuliineja G, M ja A, joista immunoglobuliini G on vallitseva. Myös resistentit koirat tuottavat samoja vasta-aineita, mutta vasta-aineiden määrä on niillä alhaisempia (Rodríguez-Cortés ym. 2007).

2.2 Kliiniset oireet ja löydökset

Koiran leishmanioosin taudinkuva riippuu koiran immuunivasteesta, eikä kaikille tartunnan saaneille koirille välttämättä kehity kliinistä leishmanioosia (ESCCAP 2012). Osa koirista pystyy eliminoimaan taudin, osalla tauti on oireeton eli subkliininen, ja osalle kehittyy vakavaoireinen kliininen leishmanioosi (Sykes ym. 2014). Taudin itämisaika vaihtelee kolmesta kuukaudesta useampaan vuoteen (ESCCAP 2012). Subkliininen tauti voi muuttua kliiniseksi jopa seitsemän vuoden itämisaajan jälkeen (Sykes ym. 2014).

2.2.1 Kliiniset oireet

Tyypillisesti ensimmäiset kliiniset oireet ovat paikallisia iho-oireita hietasääsken pistokohdassa. Nämä oireet ovat itsestään rajoittuvia ja ne jäävät usein huomaamatta (ESCCAP 2012). Taudin itämisaajan jälkeen kliiniset oireet ja niiden vakavuusaste vaihtelevat (Ciaramella ym. 1997, Koutinas ym. 1999). Useimmiten taudin ensimmäisiä huomattuja kliinisiä oireita ovat erilaiset iho-oireet. Iho-oireet ovat usein kutiamattomia, symmetrisiä ja hilseileviä ihotulehduksia, joihin voi liittyä myös karvattomuutta. Iho-oireiden tyypillisimmät alueet ovat raajat, korvanlehdet, kuono ja silmänympärykset (Koutinas ym. 1999). Muita mahdollisia iho-oireita ovat erilaiset kyhmyt, haavaumat, ihon sarveistuminen sekä kynsien epänormaali kasvu (Ciaramella ym. 1997, Koutinas ym. 1999). Haavaumia tai massamaisia vaurioita voi esiintyä myös suun ja nenän (Levy ym. 2006) sekä genitaalialueiden limakalvoilla (Ciaramella ym. 1997, Diniz ym. 2005). Tyypillisiä yleisoireita ja löydöksiä ovat painon menetys, heikkous, lihasten surkastuminen, ontuminen, suurentuneet imusolmukkeet, nenäverenvuoto, verivirtsaisuus ja kuume (Ciaramella ym. 1997, Koutinas ym. 1999). Imusolmukkeiden suurentuminen on reaktiivista imusolmukekudoksen liikakasvua tai tulehduksesta johtuvaa (Mylonakis ym. 2005). Lisäksi koiralla voi olla suurentunut perna (Koutinas ym. 1999) ja suurentunut maksa (González ym. 1988). Myös neurologiset oireet ovat mahdollisia joissain tapauksissa (Viñuelas ym. 2001, Proverbio ym. 2016a). Koiralla voi esiintyä myös ruoansulatuskanavaoireilua, kuten oksentelua ja ripulia (Ciaramella ym. 1997). Kliinisesti oireilevalle koiralle tyypillinen korostunut humoraalinen immuunivaste voi johtaa immuunikompleksien muodostumiseen (Rodríguez-Cortés ym. 2007). Immuunikompleksit

voivat varastoitua eri kudoksiin, mikä voi edesauttaa munuaiskeräsaurion (Lopez ym 1996), vaskuliitin (Pumarola ym. 1991), silmän suonikalvoston tulehduksen (Garcia-Alonso ym. 1996), lihastulehduksen (Vamvakidis ym. 2000) ja moniniveltulehduksen syntymistä (Slappendel 1988). Edetessään munuaiskeräsaurio voi johtaa krooniseen munuaisten vajaatoimintaan (Costa ym. 2003), jolloin tyypillisiä oireita ja löydöksiä ovat lisääntynyt juominen ja virtsaaminen, oksentelu sekä kuivuminen (Ciaramella ym. 1997). Koiralla voi olla silmän suonikalvoston tulehduksen lisäksi myös muita silmäoireita, kuten sarveis- ja sidekalvontulehdusta, kuivasilmäisyyttä ja silmäluomien tulehdusta (Solano-Gallego ym. 2011).

2.2.2 Laboratoriolöydökset

Yleisin laboratoriolöydös kliinisessä leishmanioosissa on lievä tai kohtalainen normosyyttinen, normokrominen, nonregeneratiivinen anemia, mikä on tyypillistä kroonisille sairauksille. Anemia voi olla myös seurausta vähentyneestä punasolujen tuotosta luuytimessä olevien parasiittien aiheuttaman luuydinhäiriön vuoksi (Nicolato ym. 2013). Munaisten vajaatoimintaa sairastavalla koiralla anemia voi johtua myös munuaisvian seurauksena syntyvän punasolujen tuotantoon tarvittavan erytropoietiini-hormonin puutteesta (DiBartola ja Westropp 2014). Kliinistä leishmanioosia sairastavilla seerumin kokonaisproteiini- ja globuliinipitoisuudet ovat yleensä koholla ja albumiinipitoisuus on vähentynyt. (de Freitas ym. 2012). Proteiinielektroforeesissa havaitaan yleensä polyklonaalinen kokonaisproteiinien nousu, jossa α_2 -globuliinipitoisuus on kohtalaisesti koholla ja γ -globuliinipitoisuus voimakkaasti koholla. α_2 -globuliinipitoisuuden nousu selittyy muun muassa akuutin faasin proteiinien lisääntymisellä ja γ -globuliinipitoisuuden nousu muun muassa kiertävillä vasta-aineilla ja immuunikomplekseilla. Myös mono-, bi- tai oligoklonaalinen globuliiniproteiinien nousu on mahdollinen (Paltrinieri ym. 2016). Hyperglobulinemia voi johtaa seerumin viskositeetin kohoamiseen (Petanides ym. 2008). Varsinkin monoklonaalinen hyperglobulinemia voi aiheuttaa hyperviskositeettisyndrooman, jossa kudosten verenkierto heikkenee aiheuttaen erilaisia vaurioita elimistön herkkiin elimiin, kuten silmiin, keskushermostoon ja sydämeen. Lisäksi se voi aiheuttaa verenkiertohäiriöitä, kuten spontaania verenvuotoa nenästä tai ikenistä (Proverbio ym. 2016a). Jopa puolella kliinisesti

sairaista koirista esiintyy verihiutalekatoa (de Freitas ym. 2012). Verihiutalekadon ja seerumin verihiutaleita vastaan kohdistuvien vasta-aineiden välillä on havaittu olevan yhteys leishmanioosia sairastavilla koirilla. Tämän vuoksi verihiutalekadon syntymekanismin uskotaan olevan sekundäärisesti immuunivälitteinen, jolloin verihiutalevasta-aineet tuhoavat koiran omia verihiutaleita (Cortese ym. 2009). Verihiutalekato voi olla myös seurausta megakaryosyyttien eli verihiutaleiden esiasteiden vioittumisesta luuytimessä. Tämän vuoksi verihiutaleiden tuotto vähenee ja viallisten verihiutaleiden tuhoaminen pernassa lisääntyy (Manzillo ym. 2006a). Valkosolujen määrä voi olla tapauksesta riippuen viiterajoissa, kohonnut tai vähentynyt (Nicolato ym. 2013, De Tommasi ym. 2014). Myös akuutin faasin proteiinien, kuten C-reaktiivisen proteiinin (CRP) ja seerumin amyloidi A:n (SAA) pitoisuudet ovat usein koholla kliinisessä leishmanioosissa. Näistä CRP on herkempi, kun taas SAA voi joillain koirilla pysyä viiterajoissa kliinisessä leishmanioosissa (Martínez-Subiela ym. 2003). Koska kliininen leishmanioosi voi vaikuttaa useisiin eri elimiin, voi koiralla olla muutoksia myös eri elinarvoissa (Paltrinieri ym. 2016). Yleisimmät löydökset ovat urea- ja kreatiniinipitoisuuksien nousu sekä maksaentsyymipitoisuuksien (alaniiniaminotransferaasi, alkalinen fosfataasi, γ -glutamyyliitransferaasi) kohtalainen kohoaminen (Ciaramella ym. 1997).

Virtsanäytteessä tyypillisiä löydöksiä ovat munuaiskeräsauriosta johtuva proteinuria, mikä havaitaan kohonneena proteiini/kreatiniinisuhteena sekä alentunut virtsan ominaispaino. Munuaistiehytvaurion seurauksena virtsassa voi olla glukoosia ja virtsan sedimentissä lisääntynyt määrä jyväslieriöitä ja solulieriöitä (DiBartola ja Westropp 2014). Myös useiden tulehdustekijöiden pitoisuudet (CRP, ferritiini, kystatiini C ja adiponektiini) voivat olla koholla virtsanäytteessä leishmanioosia ja sen seurauksena kroonista munuaisten vajaatoimintaa sairastavalla koiralla (Tvarijonaviciute ym. 2012, Martínez-Subiela ym. 2013, García-Martínez ym. 2015).

2.3 Diagnostiikka

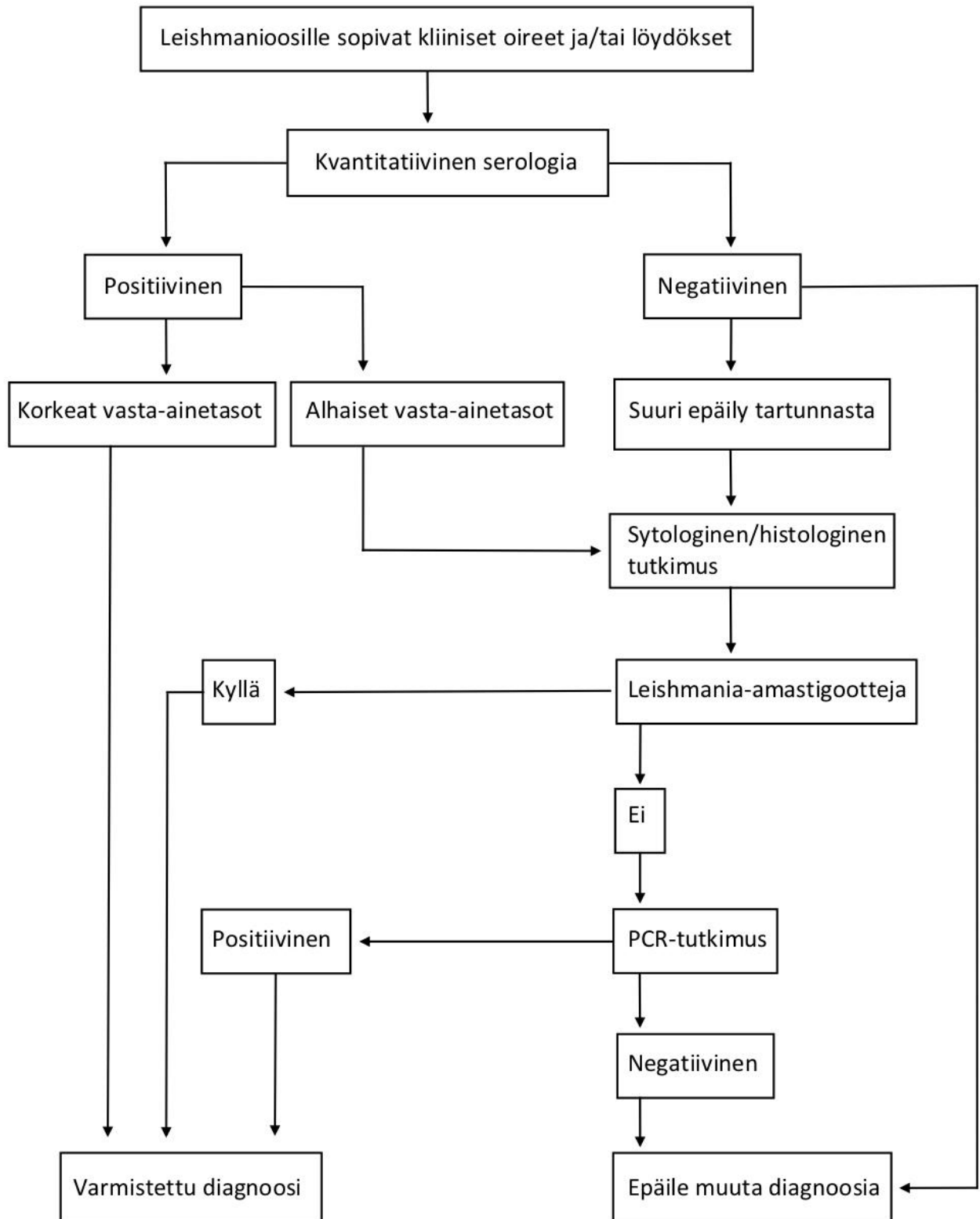
Koiran leishmanioosin diagnoosin tulisi perustua sairauteen sopiviin kliinisiin oireisiin ja kliinispatologisiin muutoksiin, muiden sairauksien poissulkuun sekä infektion ja Leishmania-spesifisten vasta-aineiden osoittamiseen. Leishmanioosin mahdollisuus tulee muistaa, jos

koira on syntynyt tai käynyt endeemisellä alueella ja sillä on vähintään yksi leishmanioosiin viittaava oire. Sairauden varhainen diagnosointi on tärkeää, sillä viivästynyt diagnoosi heikentää koiran ennustetta huomattavasti (Noli ja Saridomichelakis 2014). Oireilevalta koiralta tulee tutkia myös munuaisten toiminta, sillä munuaisten tila vaikuttaa sairauden hoitoon ja koiran ennusteeseen (Solano-Gallego ym. 2009).

Diagnostisten testien suorituskyvyn arvioinnissa voidaan käyttää testien sensitiivisyyttä eli herkkyyttä ja spesifisyyttä eli tarkkuutta. Sensitiivisyydellä tarkoitetaan testin kykyä tunnistaa sairaat eli testillä oikein sairaksi todettujen osuutta kaikista sairaista. Mikäli sensitiivisyys on alhainen, testillä saadaan paljon virheellisesti negatiivisia tuloksia. Spesifisyydellä taas tarkoitetaan testin kykyä tunnistaa terveet yksilöt eli testillä oikein terveeksi todettujen osuutta kaikista terveistä. Testillä, jonka spesifisyys on alhainen, saadaan paljon virheellisesti positiivisia tuloksia (Uhari 2004).

Koiran leishmanioosin diagnostiikassa käytettävät diagnostiset menetelmät voidaan jakaa epäsuoriin ja suoriin menetelmiin. Serologiset tutkimukset eli vasta-ainetutkimukset ovat epäsuoria menetelmiä. Suoria diagnostisia menetelmiä ovat parasitologiset testit, joita ovat sytologia, histologia, immunohistokemia, organismin viljely ja ksenodiagnostiikka sekä molekyylibiologiset PCR-menetelmät. Suorilla menetelmillä *Leishmania*-loinen voidaan havaita muutaman viikon kuluttua tartunnasta (Paltrinieri ym. 2010). PCR-menetelmä on yleensä sensitiivisempi *Leishmania*-tartunnan havaitsemisessa verrattuna serologisiin tai parasitologisiin menetelmiin. Positiivinen tulos serologisesta tai parasitologisesta testistä viittaa kuitenkin yleensä siihen, että koiralla on kliininen leishmanioosi, kun taas positiivinen PCR-tulos ei välttämättä merkitse kliinistä leishmanioosia (Oliva ym 2006). On huomioitavaa, että koira voi saada diagnostisista testeistä negatiivisen tuloksen, vaikka se olisi aikaisemmin testeillä todettu tartunnan saaneeksi. Tällä hetkellä ei tiedetä johtuuko negatiivinen löydös siitä, että koira on eliminoinut taudinaiheuttajan, taudinaiheuttajien määrä on vähentynyt havaitsemattomalle tasolle vai onko parasiitti siirtynyt toiseen kudokseen kuin tutkittu kudos (Paltrinieri ym. 2010). Taulukossa 1 kuvataan LeishVet-tutkijaryhmän mukaiset suositukset koiran leishmanioosin diagnosoimiseen. Taulukko on mukailtu julkaisusta *LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis* (Solano-Gallego ym. 2011).

Taulukko 1. Koiran leishmanioosin diagnosoiminen (Solano-Gallego ym. 2011).



2.3.1 Parasitologiset testit

2.3.1.1 Sytologia

Sytologinen tutkimus on tehokas diagnostinen tutkimusmenetelmä, kun näytteen arvioijana on ammattitaitoinen henkilö (Saridomichelakis ym. 2005). Sytologiset tutkimusmenetelmät ovat edullisia, nopeita, vaativat vain vähän teknisiä välineitä ja lisäksi ne ovat spesifisiä (Moreira ym. 2007).

Sytologisena näytteenä voidaan käyttää ohutneula-aspiraattinäytettä kudoksesta tai biologisesta nesteestä, jossa on havaittu muutoksia kliinisesti tai laboratoriotestien avulla. Biologinen neste voi olla esimerkiksi nivelnestettä, mikäli koiralla on oireena niveltulehdusta. Helpon näyte voidaan ottaa muuttuneelta ihoalueelta tai suurentuneesta imusolmukkeesta. Jos koiralla esiintyy luuydinhäiriöön viittaavia laboratoriolöydöksiä, kuten anemiaa, voidaan näyte ottaa luuytimestä (Paltrinieri ym. 2010). Parasiittitiheys on erityisen korkea ihovaurioissa, luuytimessä sekä pernassa, mutta parasiitteja voi olla myös imusolmukkeissa ja maksassa. Verestä parasiittia on hyvin vaikea havaita sytologisella tutkimuksella (Sykes ym. 2014). Jos kliinisiä oireita ei ole, suositellaan näytteenottoa elimestä tai kudoksesta, josta todennäköisyys parasiitin havaitsemiseen on korkea. Tällaisia kudoksia ovat luuydin, imusolmuke, perna ja sentrifugoidun veren valkosolu- ja verihiutalekerros (Paltrinieri ym. 2010). Lisäksi näytteen voi ottaa mistä tahansa epänormaalista massamaisesta muutoksesta, jollaisia on raportoitu leishmanioosin aiheuttamana kielessä (Viegas ym. 2012), kiveksissä (Diniz ym. 2005) sekä suussa ja kuonossa (Levy ym. 2006). Suurentuneiden imusolmukkeiden ja amastigoottien määrän välillä ei ole välttämättä yhteyttä, joten imusolmukesytologiaa kannattaa yrittää, vaikka koiran imusolmukkeet eivät olisi suurentuneet. Laadukas näyte voi kuitenkin olla haastavaa saada, mikäli imusolmuke on normaalin kokoinen (Saridomichelakis ym. 2005). Giemsa-värjättyt ohutneulanäytteet tutkitaan 600–1000-kertaisella suurennoksella, jolloin näytteen mahdolliset amastigootit voidaan havaita (OIE 2018). Parasiittien tunnistaminen on mahdollista myös Diff-Quick-värjättyistä näytteistä (Moreira ym. 2007).

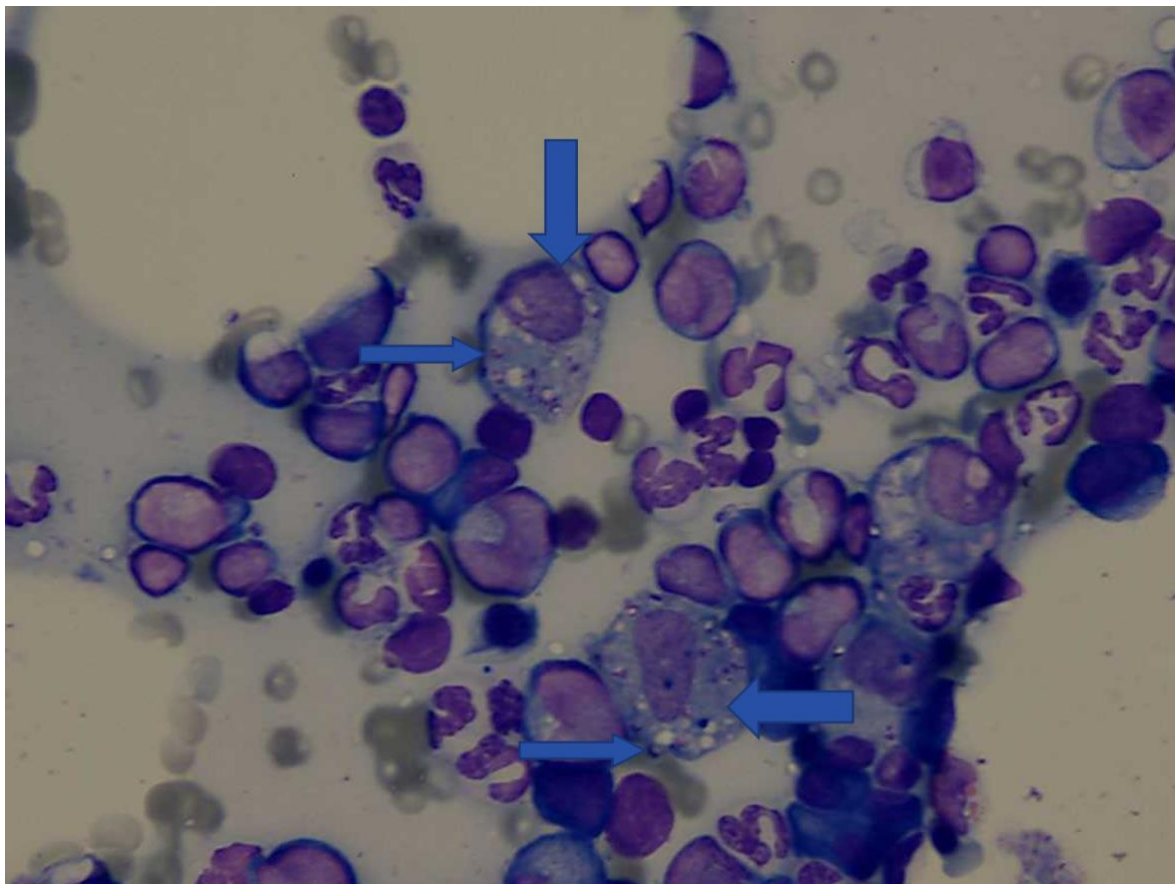
Sytologinen tutkimus voidaan tehdä myös pernan, maksan tai imusolmukekudoksen leimausnäytteestä (tissue imprint), jossa mikroskoopin objektilasia painetaan toistuvasti kudoksen tasaista leikkauspintaa vasten (Sundar ja Rai 2002). Myös ihovaurioista voidaan ottaa leimausnäyte esimerkiksi ruven alta tai haavaumasta (Reis ym. 2006). Leimausnäyte kiinnitetään absoluuttisella alkoholilla ja värjätään Giemsa-värillä ennen mikroskooppilla tutkimista. Tulos ilmoitetaan Leishmania-amastigoottien määränä sataa isäntäsolun tumaa kohden (Sundar ja Rai 2002).

Koiran kliinisten oireiden vakavuuden ja kudosten ja luuytimen parasiittitiheyden kesken on havaittu positiivinen korrelaatio, eli oireiden lisääntyessä myös parasiittien määrä lisääntyy (Reis ym. 2006). Myös ihossa havaitut mikroskooppiset vauriot ja amastigoottien määrä lisääntyvät sairauden vakavuuden lisääntyessä (Ordeix ym. 2017). Tästä johtuen sytologinen tutkimusmenetelmä on hyvin sensitiivinen menetelmiä leishmanioosidiagnostiikassa, mikäli koira on kliinisesti sairas (Saridomichelakis ym. 2005). Myös ulkoisesti normaalin näköisessä ihossa voidaan leishmanioosia sairastavalla koiralla havaita mikroskooppisia vaurioita ja Leishmania-amastigootteja (Ordeix ym. 2017). Oireettomissa tartunnoissa sytologisten menetelmien sensitiivisyys on kuitenkin huomattavasti alhaisempi. Positiivinen tulos osoittaa infektion ja lisäksi lisää todennäköisyyttä sille, että kliiniset oireet johtuvat leishmanioosista, eivätkä muusta sairaudesta. Sytologian sensitiivisyys riippuu lisäksi näytteen laadusta, näytteen arvioijan ammattitaidosta, arviointiin käytetystä ajasta ja tutkittujen näkökenttien määrästä. Hyvälaatuisessa näytteessä on oltava tarpeeksi soluja ja laadukkaita tutkittavia näkökenttiä. Lisäksi näytteenlevityksen ja värjäyksen tulee olla onnistunut eikä näytteessä saa olla mukana verta. Luuydinnäytettä on mahdoton saada ilman veren aiheuttamaa näytteen laatua heikentävää laimenemistä. Sensitiivisyys kasvaa, kun tutkitaan useampia näkökenttiä ja Saridomichelakis ym. (2005) ehdottavatkin, että tutkitaan vähintään 1000 öljyimmersionäkökenttää, mikäli ensimmäisen sadan näkökentän jälkeen tulos on negatiivinen. Myös useamman eri näytteen tutkiminen lisää sensitiivisyyttä (Saridomichelakis ym. 2005).

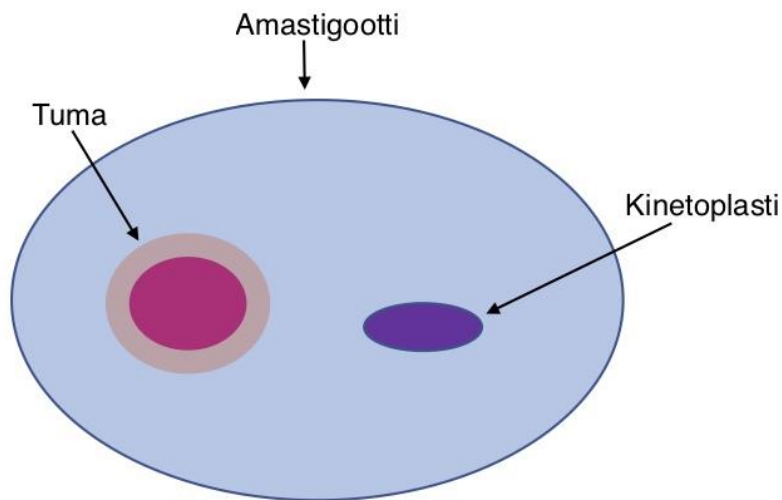
Spesifisyys riippuu näytteen tutkijan taidoista sekä näytteen laadusta. Näytteen runsas luonnollinen pigmenttimäärä voi alentaa spesifisyyttä, sillä pigmenteistä varsinkin hemosideriini saatetaan virheellisesti tulkita amastigooteiksi niiden samankaltaisen ulkonäön

vuoksi. Jos amastigoottien tunnistuksessa kuitenkin noudatetaan tarkkoja morfologisia kriteerejä, on sytologisten testien spesifisyys 100% (Saridomichelakis ym. 2005).

Sytologiassa voidaan havaita mikroskoopilla Leishmania-amastigootteja kohdekudoksen makrofageissa. Kuvassa 1 nähdään makrofageja ja niiden sisällä amastigootteja. Sivelynäytettä tehdessä voimakkaasti infektoituneet makrofagit hajoavat helposti, jolloin amastigootteja voidaan havaita myös solujen ulkopuolella (Paltrinieri ym. 2010). Havaittavat amastigootit ovat pyöreitä tai ovaalinmuotoisia, 2–3 µm pituisia solunsisäisiä organismeja. Giemsa-värijätyissä näytteissä niillä on vaaleansininen sytoplasma, jossa on suhteellisen suuri punaiseksi värijäytyvä tuma. Tuman kanssa samassa tasossa on syvän punaiseksi tai violetiksi värijäytyvä sauvamainen osa, jota kutsutaan kinetoplastiksi. Kun amastigootit on tunnistettu näytteessä, voidaan määrittää näytteen parasiittitiheys (Sundar ja Rai 2002). Kuvassa 2 havainnollistetaan amastigootin rakenne.



Kuva 1. Makrofageja (paksut nuolet) ja niiden sisällä olevia amastigootteja (ohuet nuolet) luuydinnäytteessä. MGG-värijäys 1000x suurennos. Kuva Merja Ranta.



Kuva 2. Leishmania-amastigootin rakenne. Kuva Heini Gröning.

Sytologinen tutkimus mahdollistaa parasiitin tunnistamisen lisäksi myös näytteen muiden patologisten muutosten arvioinnin. Mahdollisia havaittavia muutoksia ovat muun muassa lymfoplasmasytäärinen, granulomatoottinen tai pyogranulomatoottinen tulehdus, imusolmukkeiden reaktiiviseen suurentumiseen viittaavat muutokset, luuydinhyperplasia sekä punasolujen vähentynyt määrä luuytimessä (Paltrinieri ym. 2010). Epänormaali solukuva imusolmukkeen sytologisessa näytteessä havaitaan yleisemmin kliinisesti sairailta kuin oireettomilla tartunnan saaneilla koirilla. Leishmanioosin aiheuttama imusolmukkeiden suurentuminen on reaktiivista imusolmukekudoksen liikakasvua, tulehduksesta johtuvaa tai yhdistelmä molempia (Mylonakis ym. 2005).

2.3.1.2 Histologinen tutkimus

Histologinen arviointi voidaan tehdä tilanteessa, jossa koiralla epäillään vahvasti leishmanioosia, mutta sytologisella menetelmällä ei ole havaittu amastigootteja (Paltrinieri ym. 2010). Histologista tutkimusta varten kudoksenäytteet kiinnitetään formaliinilla, valetaan parafiiniblokeiksi, leikataan lasille ja värjätään hematoksylliini ja eosiini värjäyksellä. Koska kudoksenleikkeet ovat usein paksuudeltaan epätasaisia, ovat myös amastigootit jakautuneet leikkeeseen epätasaisesti, mikä voi tehdä näytteen tutkimisesta hidasta ja haastavaa (Sundar

ja Rai 2002). Lisäksi histologisista näytteistä amastigoottien tunnistaminen on sytologiseen menetelmään verrattuna vaikeampaa (Toplu ja Aydogan 2011). Kuitenkin jo yhden amastigootin havaitsemista mikroskoopilla kudoksenäytteestä voidaan pitää positiivisena tuloksena ja diagnoosin varmistumisena leishmanioosiksi (Sundar ja Rai 2002).

Moreiran ym. (2007) tutkimuksen mukaan korkein sensitiivisyys histologisissa ja immunohistokemiallisissa menetelmissä saadaan käytettäessä polvitaipen imusolmukkeesta otettua kudoksenäytettä. Myös muita imusolmukkeenäytteitä tai vaihtoehtoisesti perna- tai maksanäytteitä voidaan käyttää (Moreira ym. 2007). Ihobiopsia voidaan ottaa vaurioituneelta ihoalueelta, mutta myös kliinisesti terveestä ihosta voi löytää amastigootteja (de Queiroz 2011).

Kudoksenäytteissä havaittuja leishmanioosin aiheuttamia histopatologisia muutoksia ovat usein granulomatoottinen, pyogranulomatottinen tai lymfoplasmasytäärinen tulehdus sekä vaihteleva määrä makrofagien sisäisiä amastigootteja (Sykes ym. 2014). Amastigoottien määrä ja tulehdusmuutokset eivät aina korreloi suoraan. Kudoksessa voi olla suuri tulehdusreaktio ilman amastigootteja tai vain vähän tulehdusreaktiota, mutta paljon amastigootteja sisältäviä makrofageja (Xavier ym. 2006). Xavier ym. (2006) tutkimuksen mukaan kroonisessa tulehdusreaktiossa mononukleaarisia tulehdussoluja on tasaisesti verinahkan pintaosassa ja paikallisesti syvemmillä verinahkassa verisuonten, rauhasten ja karvatuppien ympärillä.

Tutkimuksessaan Toplu ja Aydogan (2011) havaitsivat amastigootteja histologisessa tutkimuksessa tartunnan saaneiden koirien imusolmukkeissa (64 %:lla tutkituista koirista), pernassa (50 %:lla), luuytimessä (45 %:lla) ja maksassa (41 %:lla) Sytologisella tutkimusmenetelmällä amastigootteja havaittiin eniten tartunnan saaneiden koirien imusolmukkeista (64 %:lla), toiseksi eniten pernasta ja luuytimestä (57 %:lla) ja kolmanneksi eniten maksasta (36 %:lla) (Toplu ja Aydogan 2011).

2.3.1.3 Immunohistokemiallinen tutkimus

Immunohistokemiallinen tutkimusmenetelmä on tekniikka, jossa spesifisiä primäärisiä vasta-aineita käyttämällä kudokset voidaan osoittaa tietty antigeeni. Suorassa immunohistokemiassa vasta-aineeseen on liitetty merkkiaine, joka mahdollistaa vasta-aine-antigeenikompleksin havaitsemisen mikroskoopilla. Epäsuorassa immunohistokemiassa merkkiaine on liitetty sekundaariseen vasta-aineeseen, joka tunnistaa ja sitoutuu primääriseen spesifiseen vasta-aineeseen. Merkkiaineena käytetään yleensä fluoresoivia väriaineita. Vaihtoehtoisesti vasta-aineisiin voidaan liittää väriä tuottavia entsyymejä, jolloin vasta-aine-antigeenikompleksi nähdään entsyymaattisen reaktion kautta. Epäsuora immunohistokemia on näistä yleisemmin käytetty menetelmä, sillä sen sensitiivisyys on korkeampi kuin suoran menetelmän. Epäsuorassa menetelmässä saadaan intensiivisempi värjäystulos, sillä yhteen primääriseen vasta-aineeseen voi sitoutua kaksi sekundaarista vasta-ainetta ja näin ollen myös kaksi merkkiainetta (Kalyuzhny 2016).

Immunohistokemiallista menetelmää voidaan käyttää täydentämään histologista tutkimusta (Toplu ja Aydogan 2011). Menetelmää voidaan käyttää, mikäli histologisessa tutkimuksessa havaitaan leishmanioosiin viittaavia histopatologisia muutoksia ilman amastigootteja (Paltrinieri ym. 2010). De Queiroz ym. (2011) tutkimuksen mukaan immunohistokemiallisella menetelmällä havaittiin histologiseen menetelmään verrattuna 12 % useammassa ihonäytteessä amastigootteja. Immunohistokemialla on mahdollista erottaa jo pieni määrä amastigootteja, sillä kontrasti ympäröivän kudoksen ja amastigootin välillä on suuri (de Queiroz ym. 2011). Yleensä menetelmässä käytetään fluoresoivalla merkkiaineella leimattuja parasiitin pintareseptoreihin sitoutuvia vasta-aineita (Sundar ja Rai 2002). Tutkimuksessaan Toplu ja Aydogan (2011) havaitsivat immunohistokemiallisella menetelmällä Leishmania-amastigootteja tartunnan saaneiden koirien imusolmukkeissa (100 %:lla tutkituista koirista), pernassa (100 %:lla), luuytimessä (91 %:lla), maksassa (82 %:lla) ja ihossa (86 %:lla). Amastigootteja havaittiin myös harvinaisemmin kielessä (45 %:lla), munuaisissa (41 %:lla), suolistossa (32 %:lla), lisämunuaisissa (23 %:lla), keuhkoissa (18 %:lla), aivoissa (14 %:lla) ja sydänlihaksessa (9 %:lla) (Toplu ja Aydogan 2011). Kudosten parasiittitiheys voi vaihdella Leishmania-tartunnan aikana riippuen koiran immuunivasteesta, kliinisestä tilasta (Barrouin-

Melo ym. 2006, Reis ym. 2006, Giunchetti ym. 2008) ja mahdollisista saaduista lääkityksistä (Manna ym. 2009).

2.3.1.4 Viljely

Vaikka viljelyä voidaan pitää 100 %:n spesifisenä menetelmänä, käytetään sitä nykyään lähinnä tutkimustarkoituksessa (Maia ja Campino 2008). Parasiitin *in vitro* viljely on kallista ja aikaa vievää, vaatii erityisosaamista sekä kallista laitteistoa. Elatusaine kontaminoituu helposti bakteereilla, hiivoilla tai sienillä, mikä vaikeuttaa parasiitin kasvua. Kontaminaatiota voidaan vähentää käyttämällä steriilejä tekniikoita ja lisäämällä elatusaineeseen bakteereja ja sieniä tappavia aineita, yleensä penisilliiniä, streptomysiiniä ja flusytosiinia (Sundar ja Rai 2002). Viljelmät tarkastetaan viikoittain neljän viikon ajan ja tulos on positiivinen, mikäli viljelmässä havaitaan promastigootteja. Pitkää viljelyaikaa vaaditaan, sillä eri kannat kasvavat eri nopeudella. Parhaiten viljelynäytteeksi sopii perna-, imusolmuke- tai luuydinnäyte. Koska pernanäytteen saaminen on invasiivinen toimenpide, on suositeltavampaa käyttää imusolmukenäytettä polvitaiveen imusolmukkeesta. Luuydinnäytettä voidaan käyttää, mikäli imusolmukkeista ei saada näytettä niiden pienen koon vuoksi (Maia ym. 2009).

Parasiittia voidaan viljellä tutkimustarkoituksiin *in vivo* laboratorioeläimissä, yleensä hamstereissa, hiirissä tai marsuissa. *In vivo* -viljelyä ei käytetä diagnostisena testinä, sillä testitulosten saaminen voi kestää kuukausia (Sundar ja Rai 2002).

2.3.1.5 Ksenodiagnostiikka

Ksenodiagnoosissa parasiitti pyritään havaitsemaan ja eristämään luonnollisen vektorin avulla (Maia ja Campino 2008). Menetelmässä laboratoriossa kasvatetut hietasääsket altistetaan tartunnalle antamalla niiden imeä mahdollisesti tartunnan saaneen koiran verta. Veriaterian jälkeen hietasääsket lopetetaan ja niiden suolensisällöt tutkitaan tartunnasta kertovien promastigoottien varalta (Paltrinieri ym. 2010). Ksenodiagnostiikkaa käytetään lähinnä epidemiologisissa tutkimuksissa, sillä se vaatii erikoislaboratorion ja tarkoissa oloissa kasvatetun hietasääskiyhdyskunnan (Maia ja Campino 2008).

2.3.2 Molekyylibiologiset testit

2.3.2.1 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

PCR on menetelmä, jossa hyvin pieniä nukleiinihappomääriä voidaan monistaa havaittavalle tasolle (Kubista ym. 2006). Uusimmilla PCR-menetelmillä on mahdollista havaita jopa 0,01 femtogrammaa *L. infantum*-DNA:ta, joka on 0,0002 parasiittia vastaava määrä (Dantas-Torres ym. 2017). PCR-menetelmän suorittamiseksi tarvitaan reaktioseos, joka sisältää monistettavaa DNA-näytettä, monistettavan *L. infantum*in DNA-jakson mukaisia alukkeita, nukleotideja ja polymeraasi-entsyymiä. Reaktioseoksen lämpötilaa nostamalla monistettavan DNA:n vastinjuosteet erkanevat toisistaan. Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan lämpötilaan, jossa alukkeet sitoutuvat yksijuosteiseen DNA:han. Kun lämpötilaa taas nostetaan, rakentaa polymeraasientsyymi alukkeista alkaen uuden vastinjuosteen reaktioseoksessa olevista nukleotideista. Tätä sykliä toistetaan, jolloin jokaisella syklillä DNA:n määrä kaksinkertaistuu (Kubista ym. 2006). Käytettyjen alukkeiden perusteella voidaan määrittellä mitä DNA-sekvenssiä halutaan monistaa (Tizard 2013). Leishmania-diagnostiikassa tutkimuksissa parhaat tulokset on saatu käytettäessä Leishmanian kinetoplasti-DNA:lle (kDNA) komplementaarisia alukkeita (Dantas-Torres ym. 2017). Kun DNA:ta on monistettu riittävästi, voidaan tyypilliset DNA-juosteet tunnistaa elektroforeesin avulla (Tizard 2013). Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä voidaan fluoresoivan väriaineen avulla havaita tietty DNA-sekvenssi tosiaikaisesti. Fluoresenssi lisääntyy DNA-määrän lisääntyessä, jolloin DNA:n määrä reaktioseoksessa voidaan mitata fluoresenssia mittaamalla (Kubista ym. 2006).

PCR-menetelmässä suositellaan näytteeksi imusolmukenäytettä, mutta mikäli koiran imusolmukkeet eivät ole suurentuneet voidaan käyttää luuydinnäytettä (Maia ym. 2009). Näytteeksi sopii myös veri tai ihon biopsianäyte, joista ihonäytteen sensitiivisyys on huomattavasti parempi, johtuen veren alhaisesta ja ihon korkeasta parasiittimäärästä tartunnan aikana. Ihon parasiittimäärä on leishmanioosia sairastavalla koiralla suuri riippumatta siitä, onko koiralla ihovaurioita vai ei (Manna ym. 2004). Verinäytteen hyviä puolia ovat näytteen helppo saatavuus ja toistettavuus, mutta verinäytteessä saattaa kuitenkin olla

PCR-reaktioita estäviä inhibiittoreita, jotka voivat aiheuttaa virhenegatiivisia tuloksia (Lachaud ym. 2002).

Tutkimuksissa on yritetty löytää myös non-invasiivisia ja helposti saatavia, mutta luotettavia näytteitä *Leishmania-loisen* osoittamiseen koirasta (Maia ym. 2009, Belinchón-Lorenzo ym. 2013). *Leishmania-loisen* DNA:ta voidaankin PCR-menetelmällä osoittaa myös tartunnan saaneen koiran silmän sidekalvon pyyhkäisynäytteistä (Ferreira ym. 2012), nenäontelon ja suun limakalvon pyyhkäisynäytteistä (Ferreira ym. 2013), siemennesteestä (Diniz ym. 2005) sekä virtsasta (Solano-Gallego ym. 2007). Virtsanäyte sopii näytteeksi, mikäli tartunnan saanut koira sairastaa munuaisten vajaatoimintaa (Solano-Gallego ym. 2007). *L. infantumin* kDNA:ta on voitu osoittaa reaaliaikaisella PCR-menetelmällä myös koiran karvanäytteistä. Tutkimuksessaan Belinchón-Lorenzo ym. (2013) havaitsivat *L. infantumin* kDNA:ta karvanäytteissä, jotka oli otettu koiran päästä, vartalosta ja kehon ääreisosista. kDNA:ta havaittiin karvan kaikista osista, mutta eniten sitä oli karvan varressa (Belinchón-Lorenzo ym. 2013).

Reaaliaikaisella PCR-menetelmällä saadaan kvantitatiivinen tulos, joten sitä voidaan käyttää koiran leishmanioosin diagnosoimisen lisäksi myös hoidon onnistumisen seurannassa (Francino ym. 2006). Luotettavin tulos seurannassa saadaan imusolmukenäytteestä tai ihobiopsiasta (Manna ym. 2004). Perinteinen PCR-menetelmä taas antaa ainoastaan kvalitatiivisen tuloksen, joten tällä menetelmällä positiivisen tuloksen saaneella koiralla voi mahdollisesti olla oireeton piilevä eli subkliininen tartunta (Francino ym. 2006).

2.3.3 Serologiset testit

Serologiset menetelmät perustuvat *Leishmania*-spesifisten vasta-aineiden (immunoglobuliini G) havaitsemiseen ja ne ovat usein ensisijaisesti käytettyjä testejä koiran leishmanioosin diagnostiikassa (Noli ja Saridomichelakis 2014). Serologisista testeistä yleisimmin käytettyjä ovat epäsuora fluoresenssimenetelmä vasta-aineiden osoittamiseen (indirect immunofluorescence antibody test, IFAT), entsyymivälitteinen immunosorbentti-menetelmä (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ja immunokromatografiaan perustuvat testit

(Maia ja Campino 2008). Vasta-aineita mitataan yleensä seerumista, mutta niitä on voitu osoittaa myös syljestä (Cantos-Barreda ym. 2018) Leishmania-spesifisiä vasta-aineita (IgG) voidaan havaita koiran seerumista aikaisintaan 8–12 viikon kuluttua tartunnasta (ESCCAP 2012). Vasta-ainepitoisuudet ovat korkeammat oireilevilla, kuin oireettomilla tai vähäoireisilla koirilla (Reis ym. 2006, Alexandre-Pires ym. 2010) ja kliinisesti oireilevalla koiralla voidaan korkeita vasta-ainetasoja pitää lähes poikkeuksetta merkinä leishmanioosista (Noli ja Saridomichelakis 2014). Alhaiset vasta-ainetasot voivat olla merkki piilevästä tartunnasta tai resistentin koiran tapauksessa altistumisesta Leishmania-tartunnalle (Noli ja Saridomichelakis 2014).

Serologisten menetelmien sensitiivisyys on tyypillisesti korkea, sillä leishmanioosille herkkien koirien humoraalinen immuunivaste on yleensä liioitellun voimakas, jolloin koirat tuottavat paljon helposti havaittavissa olevia spesifisiä vasta-aineita (Noli ja Saridomichelakis 2014), erityisesti immunoglobuliini G1:ta ja G2:ta, joista IgG2 vallitsee oireilevilla koirilla (Bourdoiseau ym. 1997). Koska parasiitti saa elimistön tuottamaan runsaasti erilaisia vasta-aineita, jotka voivat olla suku- tai lajispesifisiä, riippuu testin spesifisyys käytetystä antigeenista tai antigeenimolekyylin osasta. Sensitiivisyyteen sen sijaan vaikuttaa lähinnä käytetty menetelmä (Sundar ja Rai 2002). Leishmania-lajien kanssa samaan sukuun kuuluvat Trypanosoma-lajin parasiittitartunnat voivat alentaa joidenkin menetelmien spesifisyyttä alueilla, joilla näitä parasiitteja esiintyy. Myös muut tartunnalliset sairaudet voivat aiheuttaa ristireaktioiden vuoksi virhepositiivisia tuloksia (Noli ja Saridomichelakis 2014).

2.3.3.1 Kvantitatiiviset testit (IFAT ja ELISA)

Kvantitatiivisilla testeillä saadaan tietää koiran Leishmania-antigeenia vastaan muodostamien vasta-aineiden määrä joko vasta-aine-titterin tai optisen tiheyden avulla (Solano-Gallego ym. 2014). Vasta-ainetitterillä tarkoitetaan seerumin suurinta laimennosta, jossa testimenetelmällä havaitaan vasta-aineita (Sykes ym. 2014).

IFAT-menetelmässä testin tulkinta on subjektiivista ja riippuu paljon tulkitsijan ammattitaidosta ja kokemuksesta (Solano-Gallego ym. 2014). IFA-testi suoritetaan laittamalla

sarja tutkittavasta seerumista tehtyjä laimennoksia antigeenilla päällystetyille laselle (Paltrinieri ym. 2010) Menetelmässä voidaan käyttää antigeenina amastigootteja tai promastigootteja, joista promastigootit ovat yleisemmin käytettyjä (OIE 2018). Tämän jälkeen lasit pestään, jolloin sitoutumattomat vasta-aineet huuhtoutuvat pois. Huuhtelun jälkeen lasille lisätään fluoresoivalla merkkiaineella merkittyjä sekundäärisiä vasta-aineita, jotka sitoutuvat lasilla mahdollisesti oleviin tutkittaviin vasta-aineisiin (Sykes ym. 2014). Fluoresenssin intensiivisyyttä arvioimalla voidaan arvioida vasta-aineiden määrä (Paltrinieri ym. 2010). Testin tulos kerrotaan vasta-ainetitterinä (Sykes ym. 2014).

IFAT-menetelmään perustuvien testien on havaittu toisinaan ristireagoivan muiden patogeenien, kuten *Trypanosoma cruziin*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondiin*, *Anaplasma phagocytophilumin*, *Ehrlichia canisin* ja *Rickettsia conoriiin* kanssa (Laurenti ym. 2014, Solano-Gallego ym. 2014). Ristireaktion aiheuttama virhepositiivinen tulos on yleensä vain hieman laboratorion raja-arvoa korkeampi (Solano-Gallego ym. 2014).

Yksinkertaistetusti ELISA-menetelmässä antigeenilla päällystetyille alustoille lisätään laimennettua tutkittavaa seerumia, jolloin antigeenit ja sille spesifiset seerumin vasta-aineet sitoutuvat toisiinsa. Yhdistelmään liitetään indikaattori-antigeeni, joka saa aikaan mitattavissa olevan tuotteen, kuten värireaktion (Shetty 2005). Havaitun värireaktion voimakkuus voidaan mitata spektrofotometrillä, ja voimakkuuden perusteella saadaan määriteltyä vasta-aineiden määrä (Paltrinieri ym. 2010). ELISA-menetelmässä antigeenina voidaan käyttää amastigootteja, promastigootteja, rekombinanttiproteiineja tai puhdistettuja proteiineja. Promastigootit ja amastigootit voivat olla kokonaisia tai niistä voidaan uuttaa liukenevia aineita antigeeniksi (Solano-Gallego ym. 2014). Rekombinanttiproteiinina voidaan käyttää esimerkiksi rK39:ää, jolla on identtinen aminohappojärjestys seitsemän *Leishmania*-lajin kanssa, mukaan lukien *L. infantum* (Burns ym. 1993). ELISA-testien sensitiivisyys ja spesifisyys vaihtelee käytetyn antigeenin mukaan. ELISA-testit, joissa antigeenina käytetään promastigoottien tai amastigoottien liukenevia aineita, soveltuvat hyvin sekä oireilevien että oireettomien koirien diagnosointiin (Mettler ym. 2005).

ELISA-menetelmässä mahdollisia ristireaktioita aiheuttavia patogeeneja ovat *Babesia canis* (menetelmässä antigeenina *L. infantum* tai *L. major*) sekä *Trypanosoma cruzi*, *Neospora*

caninum ja *Ehrlichia canis* (menetelmässä antigeenina *L. major*) (Laurenti ym. 2014). Rekombinanttiproteiini rK39:n ei ole havaittu ristireagoivan *T. cruziin* kanssa (Burns 1993).

IFAT-menetelmää pidetään monissa maissa sensitiivisimpänä ja spesifisimpänä testeistä, mutta oireettomissa tartunnoissa menetelmällä on havaittu olevan huomattavasti alhaisempi sensitiivisyys verrattuna ELISA-menetelmään (Mettler ym. 2005). Sekä IFAT-, että ELISA-testien spesifisyys paranee, kun käytetään *L. infantum*-peräisiä antigeenejä *L. major*-antigeenien sijaan (da Silva ym. 2012).

Mikäli kvantitatiivisilla serologisilla testeillä halutaan seurata taudin etenemistä tai hoidon tehoa, tulee käyttää samaa laboratoriota ja samaa menetelmää, jotta arvoja voidaan verrata keskenään. Laboratorioiden välillä ei ole yhdenmukaisia raja-arvoja, mutta yleisesti korkeana titterinä voidaan pitää arvoa, joka on 2–4 kertaa korkeampi kuin laboratorion raja-arvo ja matalana titterinä arvoa, joka on 1–2 kertaa laboratorion raja-arvoa korkeampi (Paltrinieri ym. 2010).

2.3.3.2 Kvalitatiiviset testit (pikatestit)

Leishmanioosia voidaan testata pikatesteillä, jotka mittaavat kvalitatiivisesti veren vasta-aineita *Leishmania*-antigeenia vastaan (Proverbio ym. 2016b). Leishmanioosin testauksessa käytettyjä pikatestejä ovat muun muassa immunokromatografiaan ja ELISA-menetelmään perustuvat pikatestit (Dantas-Torres ym. 2018).

Vasta-aineita mittaavat immunokromatografiset testit ovat yleensä liuskatestejä, jotka koostuvat useasta materiaalikerroksesta ja joihin on kiinnitetty vasta-aineita sitovat antigeenialueet sekä värin aiheuttava molekyyli. Liuskoissa on mukana usein myös tyyny, joka erottelee plasman kokoverestä. Yksinkertaistetusti menetelmässä näyte kulkeutuu kapillaarivoimien avulla pitkin testiliuskaa, jolloin näytteessä mahdollisesti olevat vasta-aineet sitoutuvat antigeeniä sisältäviin alueisiin. Positiivinen tulos voidaan nähdä alueelle muodostuneena värireaktiona muutamassa minuutissa (von Lode 2005).

ELISA-pikatestissä tutkittava näyte sekoitetaan entsyymimerkittyä konjugoitunutta antigeenia sisältävään liuokseen, jolloin seerumissa mahdollisesti olevat vasta-aineet sitoutuvat antigeeneihin. Liuos laitetaan testilaitteeseen, jolloin liuos kulkeutuu pitkin testikalvon väliainetta ja vasta-aine-antigeenikompleksit sitoutuvat kalvon testialueelle kiinnitettyihin antigeeneihin. Pikatesti aktivoidaan painamalla laitteen aktivaattoria, joka vapauttaa huuhtelevan puskuriliuoksen. Positiivinen testitulos nähdään värireaktionä testikalvolla muutaman minuutin kuluttua (O'Connor 2015).

Pikatestien käyttämät antigeenit vaihtelevat ja antigeenina voidaan käyttää esimerkiksi puhdistettuja promastigootteja, rekombinanttiproteiinia tai fuusiota kahdesta rekombinanttiproteiinista (Laurenti ym. 2014, Dantas-Torres ym. 2018). Pikatestit ovat edullisia ja ne eivät vaadi erityisiä laboratoriovälineitä tai ammattiosaamista, sillä tulokset ovat yksiselitteisesti tulkittavissa positiiviseksi tai negatiiviseksi (Otranto ym. 2004, Proverbio ym. 2016b). Positiivinen tulos ei kuitenkaan kerro vasta-ainetasosta lainkaan, joten usein vaaditaan lisäksi kustannuksia lisäävä kvantitatiivinen testi (Solano-Gallego ym. 2014). Leishmania-tartunnan diagnostiikassa onkin suositeltavampaa käyttää pikatestien sijaan kvantitatiivisia menetelmiä (Paltrinieri ym. 2010). Pikatestit sopivat kliinisesti sairaan koiran diagnoosin varmistamiseen, sillä ne ovat oireilevilla koirilla hyvin spesifisiä testejä (Mettler ym. 2005, Proverbio ym. 2016b). Lisäksi pikatestejä voidaan käyttää erottelemaan rokotuksen ja todellisen tartunnan aiheuttamaa vasta-aineiden nousua, kun käytetään pikatestiä, jonka sisältämää antigeenia ei ole käytetty rokotuksessa (Noli ja Saridomichelakis 2014).

Yleisesti pikatestien spesifisyys on melko korkea, mutta sensitiivisyys vaihtelee hyvin paljon ja testeillä saadaan melko paljon virhenegatiivisia tuloksia (Paltrinieri ym. 2010). Ainakin koirilla oleva *Babesia canis* -tartunta saattaa aiheuttaa immunokromatografisessa pikatestissä virhepositiivisen tuloksen (Laurenti ym. 2014). ELISA-pikatestissä virhepositiivisia tuloksia on havaittu koirilla, joilla on *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis* tai *Ehrlichia canis* -tartunta (Marcondes ym. 2010). Pikatesteillä saattaa olla alhainen sensitiivisyys oireettomien tartuntojen havaitsemisessa (Solano-Gallego ym. 2014), mutta joidenkin tutkimusten mukaan sensitiivisyys on hyvä myös oireettomia tartuntoja tutkittaessa (Laurenti ym. 2009, Dantas-Torres ym. 2018).

2.4 Lääkehoito

Koiran leishmanioosin hoidossa yleisimmin käytettyjä lääkkeitä ovat meglumiiniantimoniaatti, miltefosiini ja allopurinoli (Solano-Gallego ym. 2009). Miltefosiinilla ja meglumiiniantimoniaatilla on Leishmania-loista tappava vaikutus, kun taas allopurinoli estää loisen lisääntymistä. Tästä syystä paras hoitotulos saadaan käytettäessä yhdistelmähoitona joko miltefosiinia ja allopurinolia tai meglumiiniantimoniaattia ja allopurinolia (Miró ym. 2009). Pitkäaikaisseurannassa meglumiiniantimoniaatin ja allopurinolin yhdistelmähoidolla sairauden uusiutuminen on havaittu hieman vähäisemmäksi kuin miltefosiinin ja allopurinolin yhdistelmähoidolla (Manna ym. 2015). Maailman terveysjärjestö WHO suosittelee, että koirien leishmanioosia hoidettaisiin ainoastaan allopurinolilla, kun taas meglumiiniantimoniaatti ja miltefosiini säästettäisiin ihmisten leishmaniaasin hoitoon (WHO 2010).

Sekä miltefosiini- että meglumiiniantimoniaattilääkityksen avulla koira voi parantua kliinisesti, mutta täydellistä parasitologista paranemista ei yleensä saavuteta, vaan koira jää Leishmania-loisen kantajaksi ja oireiden uusiutuminen on näin ollen mahdollista (Manna ym. 2008, Manna ym. 2009, Miró ym. 2009). Hoidosta huolimatta osa koirista voi myös jäädä infektiivisiksi hietasääskille, mutta infektiivisyys vähenee onnistuneella hoidolla huomattavasti (Miró ym. 2011).

2.4.1 Allopurinoli

Allopurinoli on koiran leishmanioosin pitkäaikaislääkityksessä käytetty puriinianalogeihin kuuluva lääkeaine, joka vähentää Leishmania-loisten lisääntymistä elimistössä. Leishmania-loiset metaboloivat allopurinolia inosiinin inaktiiviseksi analogiksi, joka aiheuttaa virheellistä proteiinien translaatiota loisen soluissa ja näin ollen loisen lisääntyminen estyy (Baneth ja Shaw 2002). Allopurinolia on Suomessa saatavilla reseptivalmisteena apteekkeista muun muassa kauppanimillä Allonol (Ratiopharm GmbH), Apurin Sandoz (Sandoz A/S) ja Zyloric (Aspen Pharma Trading Limited) (Yliopiston apteekin asiakaspalvelu, suullinen tiedonanto 10/2018). Allopurinolia annetaan koiralle suun kautta kahdesti päivässä annoksella 10 mg/kg

(Koutinas ym. 2001, Pennisi ym. 2005, Plevraki ym. 2006). Allopurinolin käytöllä saadaan koiran kliinisiä oireita vähenemään ja jopa loppumaan kokonaan, mutta parasitologista paranemista ei saavuteta pelkällä allopurinolilääkityksellä (Koutinas ym. 2001). Allopurinolilääkitys kuitenkin vähentää ihon parasiittimäärää (Pennisi ym. 2005), mikä vähentää koiran infektiivisyyttä hietasääskille (Ordeix ym. 2017). Allopurinolin käyttö myös vähentää todennäköisyyttä sille, että kliininen leishmanioosi uusiutuu, mutta se ei kuitenkaan poista uusiutumisen mahdollisuutta (Koutinas ym. 2001, Torres ym. 2011). Solano-Gallego ym. (2009) ehdottavat, että allopurinolilääkitys voidaan mahdollisesti lopettaa, mikäli koira on syönyt lääkettä vähintään vuoden, koiran kliiniset oireet ja löydökset ovat kadonneet täysin ja koiran *Leishmania*-vasta-aineita ei ole todettavissa tai vasta-ainetasot ovat raja-arvolla positiiviset.

Ihmisillä allopurinoli on tutkimuksissa havaittu munuaistoksiseksi, mutta koirilla se ei tutkimusten mukaan ole yhtä haitallista munuaisten toiminnalle (Plevraki ym. 2006). Kroonisesta munuaisten vajaatoiminnasta kärsivillä koirilla saattaa kuitenkin olla tarpeellista alentaa allopurinolin annostusta annokseen 5 mg/kg kahdesti päivässä annettuna (Plumb 2018).

Allopurinolia käytetään myös ehkäisemään uraattikiteitä, sillä se estää ksantiinioksidaasientsyymiä, joka muuttaa puriinien aineenvaihduntatuotteita, ksantiinia ja hypoksantiinia, virtsahapoksi (Bartges ym. 1999). Tämän mekanismin vuoksi allopurinoli altistaa ksantiini-virtsakiville, joten allopurinolia syövän koiran hoitoon tulisi ksantiinikivien ennaltaehkäisemiseksi yhdistää vähäpuriininen ruokavalio (Torres ym. 2011). Kaupallisista valmisteista vähäpuriinisia ruokia ovat esimerkiksi Royal Canin Urinary U/C Low Purine (Royal Canin 2018) ja Hill's Prescription Diet Canine u/d (Hill's 2018).

Allopurinolilla hoidetuilla koirilla on todettu allopurinoliresistenssiä. Tutkimuksessaan Yasur-Landau ym. (2016) totesivat allopurinolilla lääkityillä koirilla, joiden kliininen leishmanioosi uusiutui hoidon aikana, *L. infantum*-promastigoottien allopurinoliherkkyyden olevan 3–4 kertaa heikompi kuin koirilla, joita ei ollut hoidettu allopurinolilla. Taudin uusiutuessa tuleekin muistaa allopurinoliresistenssin mahdollisuus (Yasur-Landau ym. 2016).

2.4.2 Miltefosiini

Miltefosiini on alkyylifosfokoliineihin kuuluva lääkeaine, joka aiheuttaa *Leishmania*-amastigoottien DNA:n hajoamisen ja sen myötä solujen apoptoosin kaltaisen kuoleman (Verma ja Dey 2004). Miltefosiinin annostelu koiralle on helppoa, sillä lääke annetaan suun kautta (Miró ym. 2009). Suomessa miltefosiinivalmistetta (Milteforan, Virbac) on saatavilla Lääkelaitoksen erityisluvalla (Fimea 2018). Miltefosiinia käytetään leishmanioosin hoidossa yhdistettynä allopurinoliin (Miró ym. 2009). Yhdistelmä-lääkityksessä koiralle annetaan 28 vuorokauden ajan miltefosiinia kerran päivässä annoksella 2 mg/kg ja allopurinolia kahdesti päivässä annoksella 10 mg/kg, jonka jälkeen jatketaan pelkällä allopurinolilääkityksellä (Manna ym. 2009, Miró ym. 2009). Kliinisten oireiden on havaittu vähenevän etenevästi lääkeyksityksen aloituksen jälkeen (Manna ym. 2009, Miró ym. 2009, Manna ym. 2015). Koiran elimistön parasiittimäärän on todettu vähenevän huomattavasti kuukauden yhdistelmähoiton jälkeen ja pysyvän sen jälkeen alhaisena allopurinolilääkityksellä (Miró ym. 2009, Manna ym. 2015). Myös koirien vasta-ainetasot laskevat jo kuukauden hoitojakson jälkeen, mutta vasta-ainetasojen lasku voi olla hidasta, eikä se aina korreloi kliinisten oireiden vähenemisen kanssa (Mateo ym. 2009, Miró ym. 2009). Mikäli koiran oireet palaavat, voidaan yhdistelmähoito tarvittaessa uusua (Manna ym. 2009). Yhdistelmä-lääkitys on todettu hyvin siedetyksi koirilla, eikä se yleensä aiheuta haittavaikutuksia (Miró ym. 2009). Tutkimuksessaan Miró ym. (2009) eivät myöskään havainneet maksa- tai munuaisarvoissa lisänousua koirilla, joilla hoidon alussa kyseiset arvot olivat koholla. Yleisimpiä miltefosiinilääkityksen aiheuttamia haittavaikutuksia ovat lievät ruoansulatuskanavaoireet, kuten oksentelu, ripuli ja ruokahaluttomuus (Bianciardi ym. 2009, Mateo ym. 2009). Oireilu on annosriippuvaista ja suositetulla miltefosiiniannostuksella haittavaikutukset ovat yleensä lieviä ja itsestään ohimeneviä (Bianciardi ym. 2009).

2.4.3 Meglumiiniantimoniaatti

Meglumiini on pentavalentteihin antimoneihin kuuluva lääkeaine, joka estää valikoiden leishmaniaalisia entsyymejä, joita loinen tarvitsee rasvahappojen oksidaatioon ja glykolyysiin (Baneth ja Shaw 2002). Suomessa meglumiiniantimoniaattivalmistetta (Glucantime, Merial)

on saatavilla Lääkelaitoksen erityisluvalla (Fimea 2018). Meglumiiniantimoniaatti on todettu tehokkaaksi joko yksin käytettynä tai yhdistettynä allopurinoliin. Yhdistelmä-lääkityksenä allopurinolin kanssa meglumiiniantimoniaattikuurin pituus on kuitenkin lyhyempi kuin käytettynä pelkästään meglumiiniantimoniaattia. Lyhyemmällä kuurilla lääkeyksen kustannukset jäävät huomattavasti alhaisemmiksi (Denerolle ja Bourdoiseau 1999). Meglumiiniantimoniaattia annostellaan koiralle nahanalaisena injektiona kuukauden ajan 100 mg/kg kerran päivässä (Manna ym. 2008, Mateo ym. 2009) tai 50 mg/kg kahdesti päivässä (Mateo ym. 2009, Miró ym. 2009). Lisäksi koiralle annetaan allopurinolia suun kautta kahdesti päivässä 10 mg/kg ja allopurinolilääkitystä jatketaan samalla annoksella myös meglumiiniantimoniaattikuurin päätyttyä (Manna ym. 2008). Tutkimuksissa on todettu koiran kliinisten oireiden, elimistön parasiittimäärän ja vasta-ainetasojen vähenevän 1–3 kuukaudessa yhdistelmä-lääkityksen aloituksesta (Manna ym. 2008, Mateo ym. 2009, Miró ym. 2009, Manna ym. 2015). Vasta-ainetasot eivät kuitenkaan aina alene ensimmäisten viikkojen aikana lääkeyksen aloituksesta, joten niiden mittaaminen ei ole luotettava tapa arvioida hoidon onnistumista (Mateo ym. 2009). Joillakin koirilla vasta-ainetasot voivat jäädä pysyvästi korkealle tasolle (Torres ym. 2011). Meglumiiniantimoniaatin mahdollisia haittavaikutuksia ovat ruoansulatuskanavan häiriöt, injektio-kohtainen kipu, lihaskipu ja nivelten jäykkyys (Baneth ja Shaw 2002). Meglumiiniantimoniaatti on myös munuaistoksista ja se voi aiheuttaa munuaistiehyiden vaurioita (Bianciardi ym. 2009). Meglumiiniantimoniaattia ei tulisi käyttää koirilla, jotka kärsivät vakavasta munuaisten vajaatoiminnasta (Solano-Gallego ym. 2009).

2.4.4 Muita leishmanioosin hoidossa käytettäviä lääkkeitä

2.4.4.1 Domperidoni

Koirilla domperidonia käytetään lähinnä kliinisen leishmanioosin ehkäisemiseen, mutta sitä voidaan käyttää myös leishmanioosin hoidossa (Sabaté ym. 2014). Domperidonin on havaittu vähentävän kliinisiä oireita ja vasta-ainetasoja varsinkin leishmanioosin lievässä muodossa (Gómez-Ochoa ym. 2009). Leishmanioosille resistenteillä koirilla on tyypillisesti voimakas suojaava Th1-soluvälitteinen immuunivaste, kun taas sairaudelle herkillä koirilla on voimakas humoraalinen Th2-välitteinen immuunivaste ja alentunut Th1-soluvälitteinen immuunivaste

(Paltrinieri ym. 2010). Domperidoni on dopamiinin D2-reseptorien salpaaja, joka serotoniinin vapauttamisen myötä lisää prolaktiinin tuotantoa (Gómez-Ochoa ym. 2009). Prolaktiini aktivoi Th1-soluvälitteistä immuunivastetta sekä lisää muun muassa gamma interferonin, interleukiini-2:n, interleukiini-12:n ja tuumorinekroositekijä alfan eritystä (Majumder ym. 2002). Tämä aktivoi makrofageja ja luonnollisia tappajasoluja, mikä puolestaan vähentää TGF beetan (transformoiva kasvutekijä beeta) aktiivisuutta ja Th2-välitteistä immunitteettia (Richards ym. 1998). Tämä saattaa alentaa leishmanioosin kliinisiä oireita ja vasta-ainetasoja etenkin sairauden alkuvaiheessa. Vuoden mittaisessa seurantatutkimuksessa annoksella 1 mg/kg kahdesti päivässä suun kautta annettuna 30 päivän ajan domperidoni vähensi kaikkien lievästi oireilevien koirien kliinisiä oireita 90 päivässä. Näistä koirista 74 %:lla vasta-aineiden määrä seerumissa aleni merkittävästi ja 40 %:lla vasta-ainemäärät laskivat alle määritysrajan tutkimuksen lopussa. Vastaavasti tutkituilla vakavasti oireilevilla koirilla kliiniset oireet helpottivat 86 %:lla ja vasta-aineiden määrä aleni 36 %:lla (Gómez-Ochoa ym. 2009). Lyhyessä seurantatutkimuksessa domperidonia annettiin edellisen annoksen sijaan 0,5 mg/kg kerran päivässä suun kautta 30 päivän ajan lieväoireista tai kohtalaista leishmanioosia sairastaville koirille. Tälläkin annoksella 85 %:lla koirista vasta-aineiden määrä väheni ja 45 %:lla suurentuneet imusolmukkeet pienenivät (Gómez-Ochoa ym. 2011). LeishVet-tutkijaryhmä suosittelee domperidonia käytettävän lieväoireisille koirille annoksella 0,5 mg/kg kerran päivässä kuukauden ajan (Baneth ym. 2018). Domperidonilla on raportoitu vain vähän haittavaikutuksia, joista yleisimmät ovat lisääntynyt maidontuotanto lääkkityksen alussa sekä lievät ruoansulatuskanavahäiriöt (Sabaté ym. 2014).

Mualla Euroopassa domperidonia myydään kauppanimellä Leisguard. Suomessa domperidonia on saatavilla Fimean erityisluvalla kauppanimillä Motilium-tabletit, Motilium Trophen-suspensio sekä Leisguard-oraalisuspensio (Fimea 2018).

2.4.4.2 Amfoterisiini B

Vaikka amfoterisiini B onkin kirjallisuudessa mainittu yhdeksi leishmanioosin hoitovaihtoehtoista (Baneth ja Shaw 2002), se ei ole ensisijaisesti käytetty lääke koiran leishmanioosin hoidossa (Solano-Gallego ym. 2009). Lääke on tehokas, mutta sen käyttö koirilla voi lisätä riskiä lääkeresistenssin kehittymiselle ihmisillä (Best ym. 2014). Lisäksi sillä

on usein haittavaikutuksia, joista yleisimmät ovat ruokahaluttomuus ja oksentelu (Lamothe 2001, Cortadellas 2003). Amfoterisiini B aiheuttaa myös munuaisissa verisuonten supistumista ja alentaa munuaiskerästen suodattumisnopeutta, jonka vuoksi se on munuaistoksinen lääkeaine. Amfoterisiini B sitoutuu loisen solukalvolla olevaan ergosteroliin, minkä seurauksena solukalvolle muodostuu pieniä huokosia, josta elektrolyytit pääsevät läpi. Tämä aiheuttaa loisen kuoleman (Lamothe 2001). Vaikka amfoterisiini B:llä on Leishmania-loista tappava vaikutus, sillä ei kuitenkaan aina saavuteta koiralla täydellistä parasitologista paranemista, vaan taudin uudelleenpuhkeaminen on mahdollista lääkehoidon jälkeen (Cortadellas 2003).

Amfoterisiini B annostellaan koiralle hitaana suonensisäisenä infuusiona kahdesti viikossa vähintään kahdeksan viikon ajan (Lamothe 2001, Cortadellas 2003). Lamothe (2001) suosittelee aloittamaan annoksella 1 mg/kg jonka jälkeen annosta nostetaan niin, että koiran saama yhteenlaskettu annos on vähintään 10 mg/kg. Tutkimuksissaan Lamothe (2001) ja Cortadellas (2003) ovat käyttäneet suurimmillaan kerta-annosta 2,5 mg/kg. Munuaistoksisuuden vuoksi lääke annetaan rasvaemulsiossa. Lisäksi on suositeltavaa nesteyttää koira suonensisäisesti ja lääkittää mannitolilla ennen amfoterisiini B:n annostelua sekä tarkistaa koiran seerumin munuaisten toimintaa kuvaava kreatiniiniarvo ennen jokaista lääkityskertaa (Lamothe 2001).

2.5 Luokittelu ja ennuste

Koiran leishmanioosille on useita eri luokitteluja, joista tunnetuimmat ovat LeishVet ja Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG) -tutkijaryhmien mukaiset luokittelut. Sairauden edetessä tai hoidon tehotessa koiran saama luokittelu voi muuttua. Luokittelujen perusteella voidaan antaa viitteitä koiran ennusteesta ja LeishVet-tutkijaryhmä antaa myös hoitosuosituksia luokitusten mukaan (Solano-Gallego ym. 2009, Paltrinieri ym. 2010, Roura ym. 2013).

2.5.1 LeishVet-luokittelu

LeishVet-tutkijaryhmän mukaan koiran leishmanioosi voidaan luokitella vasta-aineiden määrän, kliinisten oireiden ja laboratoriolöydösten perusteella luokkiin I-IV. Koiran lääkitys ja ennuste voidaan arvioida sen perusteella, minkä asteisena sairaus koiralla esiintyy. Taulukossa 2 esitellään mukailtuna LeishVet-tutkijaryhmän mukainen sairauden luokittelu, löydökset, hoito ja ennuste. Taulukko on mukailtu Solano-Gallego ym. (2009) julkaisusta Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Koiralla sairauden edetessä esiintyvää munuaisten vajaatoimintaa tulee hoitaa IRIS-luokituksen (International Renal Interest Society 2016, <http://www.iris-kidney.com>) mukaisilla ohjeilla (Solano-Gallego ym. 2009).

Taulukko 2. LeishVet-ryhmän mukainen leishmanioosin luokittelu (mukailtu Solano-Gallego ym. 2009)

Luokitus	Serologia	Kliiniset oireet	Laboratoriolöydökset	Hoitovaihtoehdot	Ennuste
I: Lievä sairaus	Ei vasta- aineita tai matala vasta- ainepitoi- suus	Lievät oireet, esimerkiksi ihovaurioita tai suurentuneet imusolmukkeet	Yleensä ei epänormaaleja löydöksiä Munuaisprofiili a. normaali: - kreatiniini < 125 µmol/l - UP/C < 0,5	Ei lääkehoitoa Allopurinoli Allopurinoli + meglumiini- antimoniaatti/ miltefosiini	Hyvä
II: Kohtalai- nen sairaus	Matala, kohtalainen tai korkea ¹ vasta- ainepitoi- suus	Luokan I oireiden lisäksi kohta- laiset oireet, esimerkiksi laajat ihovauriot, ruoka- haluttomuus, painonmenetyk- s, kuume tai nenäverenvuoto	Epänormaaleja löydöksiä, esimerkiksi lievä nonregeneratiivinen anemia, hypoalbuminemia, seerumin viskositeetin lisääntyminen Munuaisprofiili a. normaali - kreatiniini < 125 µmol/l - UP/C < 0,5 b. IRIS I, proteinuria - kreatiniini < 125 µmol/l - UP/C 0,5–1	Allopurinoli + meglumiini- antimoniaatti/ miltefosiini	Hyvä tai varaukselli- nen

(jatkuu)

Taulukko 2. (jatkuu)

Luokitus	Serologia	Kliiniset oireet	Laboratoriolöydökset	Hoitovaihtoehdot	Ennuste
III: Vakava sairaus	Kohtalainen tai korkea vasta- ainepitoi- suus	Luokkien I—II oireiden lisäksi immuuni- kompleksien aiheuttamia vaurioita, esimerkiksi vaskuliitti, niveltulehdus, uveiitti tai glomerulo- nefriitti	Epänormaaleja löydöksiä Munuaisprofiili a. IRIS I, proteinuria - kreatiniini < 125 µmol/l - UP/C > 1 b. IRIS II, ei proteinuriaa - kreatiniini 125—180 µmol/l - UP/C < 0,5 c. IRIS II, proteinuria - kreatiniini 125—180 µmol/l - UP/C > 0,5	Allopurinoli + meglumiini- antimoniaatti/ miltefosiini Lisäksi munuais- sairauden hoito IRIS-ohjeiden mukaisesti	Varaukselli- nen tai huono
IV: Erittäin vakava sairaus	Kohtalainen tai korkea vasta- ainepitoi- suus	Luokan III oireet tai keuhkoveri- tulppa, nefroottinen syndrooma tai loppuvaiheen munuaisvaurio	Epänormaaleja löydöksiä Munuaisprofiili a. IRIS III - kreatiniini 180—440 µmol/l b. IRIS IV - kreatiniini > 440 µmol/l c. nefroottinen syndrooma - UP/C > 5	Allopurinoli Lisäksi munuais- sairauden hoito IRIS-ohjeiden mukaisesti	Huono

¹ vähintään 3—4 kertainen vasta-ainepitoisuus laboratorion raja-arvoon nähden
IRIS = International Renal Interest Society; UP/C = virtsan proteiinin ja kreatiniinin suhde: UP/C < 0,5 = ei merkittävästi proteiinia virtsassa, UP/C > 0,5 = merkittävästi proteiinia virtsassa

2.5.2 CLWG-luokittelu

Tutkijaryhmä CLWG (Canine Leishmaniasis Working Group) luokittelee leishmanioosia sairastavat koirat viiteen luokkaan (luokat A—E) diagnostisten testien tulosten, kliinisten oireiden ja laboratoriolöydösten perusteella. Taulukossa 3 esitellään CLWG-tutkijaryhmän mukainen luokittelu (Paltrinieri ym. 2010, Roura ym. 2013).

Taulukko 3. CLWG-ryhmän mukainen leishmanioosin luokittelu (mukailtu Paltrinieri ym. 2010 ja Roura ym. 2013)

Luokitus	Diagnostisten testien tulos	Kliiniset oireet	Laboratorio- löydökset	Ennuste
A. Tartunnalle altistunut koira	Alhaiset vasta-ainetasot sekä negatiivinen tulos sytologiasta, histologiasta tai PCR:stä	Ei leishmanioosiin viittaavia oireita	Ei epänormaaleja löydöksiä	Hyvä
B. Tartunnan saanut koira	Alhaiset vasta-ainetasot sekä positiivinen tulos sytologiasta, histologiasta tai PCR:stä	Ei leishmanioosiin viittaavia oireita	Ei epänormaaleja löydöksiä	Hyvä, mikäli tartunta ei etene kliiniseksi sairaudeksi
C. Kliinisesti sairas koira	Korkeat vasta-ainetasot tai alhaiset vasta-ainetasot sekä positiivinen tulos sytologiasta, histologiasta tai PCR:stä	Leishmanioosille tyypillisiä oireita (yksi tai useampia)	Leishmanioosiin sopivia löydöksiä	Hyvä tai varauksellinen oireiden ja löydösten vakavuudesta riippuen Munuaisvaurio heikentää ennustetta
D. Vakavasti kliinisesti sairas koira	-	Vakavat silmäoireet tai nivelsairaus ja/tai immunosuppressiivista terapiaa vaativa sairaus Lisäksi muu sairaus, kuten kasvainsairaus, endokriininen- tai metabolinen sairaus	Leishmanioosiin sopivia löydöksiä Krooninen munuaisten vajaatoiminta tai proteinuria	Hyvä tai varauksellinen, jos koira vastaa hoitoon ja munuaisvaurio IRIS I—II luokan mukainen Huono, jos munuaisvaurio IRIS III—IV luokan mukainen
E. Hoitoon vastaamaton tai uudestaan sairastunut koira	-	Leishmanioosille tyypilliset kliiniset oireet eivät häviä lääkityksellä tai koira sairastuu uudestaan kliinisesti pian lääkityksen jälkeen	-	Hoitoon vastaamattomilla huono Uudestaan sairastuneilla kuten luokassa D

IRIS = International Renal Interest Society

2.6 Sairauden seuranta

2.6.1 Terve koira

Kliinisesti oireettomalta, endeemisellä alueella olleelta koiralta kannattaa tutkia *Leishmania*-loista kohtaan muodostuneiden vasta-aineiden määrä 6–12 kuukauden välein, mikäli mahdollisesti puhkeava leishmanioosi halutaan havaita ajoissa (Solano-Gallego ym. 2011). Korkeat vasta-ainetitterit voivat viitata alkavaan kliiniseen leishmanioosiin ja tällöin koiralla kannattaa aloittaa lääkitys (Solano-Gallego 2009). Mikäli vasta-aineita on vain vähän eikä koiralla ole kliinisiä oireita, voidaan sairauden kehitystä seurata ennen lääkityksen aloitusta. Tällöin vasta-ainetitteri, peruselinarvot, verenkuvat ja koiran kliininen vointi tulisi kontrolloida 3–6 kuukauden välein (Solano-Gallego 2011).

2.6.2 Sairas koira

Lääkityksen aloittamisen jälkeen on suositeltavaa, että koiralta tutkitaan täydellinen verenkuvat, peruselinarvot, virtsanäyte sekä virtsan proteiinin ja kreatiniinin suhde (Solano-Gallego 2009). Myös akuutin faasin proteiinit voidaan tutkia ja CRP:n tulisi olla viiterajoissa ensimmäisessä kontrollissa (Martínez-Subiela ym. 2003). Ensimmäinen kontrolli tulisi tehdä kuukauden kuluttua lääkityksen aloittamisesta ja tämän jälkeen arvot tulisi kontrolloida 3–4 kuukauden välein. Mikäli koira paranee lääkityksellä kliinisesti, voidaan kontrolliväliä jatkossa pidentää 6–12 kuukauteen. Seerumin vasta-ainetasot suositellaan tutkittavan 6 kuukauden välein lääkityksen aloittamisen jälkeen (Solano-Gallego 2009). On kuitenkin huomioitava, että vasta-aineiden määrän väheneminen on yksilöllistä, eikä sitä tapahdu kaikilla koirilla kliinisestä paranemisesta huolimatta (Solano-Gallego 2009, Cantos-Barreda ym. 2018). Vasta-aineiden lisääntyminen kuitenkin yleensä viittaa kliinisen leishmanioosin uudelleen puhkeamiseen eli relapsiin (Solano-Gallego 2009). Myös CRP:n nousun on todettu ennakoivan leishmanioosin relapsia (Sasanelli ym. 2007). Mikäli koiralla havaitaan kroonista munuaisten vajaatoimintaa, tulee munuaisten toimintaa kontrolloida IRIS-suositusten mukaisesti (Paltrinieri ym. 2016).

2.7 Tartunnan ehkäisy

2.7.1 Ulkoloislääkkeet

Koska koiralle tartunnan aiheuttavat *Leishmania*-promastigootit siirtyvät koiraan hietasääsken piston yhteydessä, ovat hietasääskiä karkottavat valmisteet tärkein tartuntaa ehkäisevä tekijä (Miró ym. 2017). Koirilla tulisi leishmanioosin endeemisillä alueilla oleskeltaessa käyttää ulkoloislääkkeitä hietasääskien esiintymiskaudella. Esiintymiskausi vaihtelee alueittain, mutta yleensä sen oletetaan olevan huhtikuusta marraskuuhun (Solano-Gallego ym. 2011). On myös tärkeää pitää koirat sisätiloissa iltaisin ja öisin, jolloin hietasääsket ovat aktiivisimmillaan (Gálvez ym. 2010). Suomessa myyntiluvan omaavien lääkevalmisteiden ominaisuuksia on esitelty taulukossa 4.

Taulukko 4. Ulkoloislääkkeet *Leishmania*-tartunnan ehkäisyssä.

Vaikuttava aine	Muoto	Valmiste	Vaikutus	Vaikutuksen kesto	Teho saavutetaan	Lähde
Deltametriini (4 %)	Panta	Scalibor	Hietasääskiä karkottava ja tappava	5–6 kuukautta	1 viikossa (maksimiteho 2 viikossa)	Killick-Kendrick ym. 1997, Pharmaca Fennica Veterinaria 2018
Flumetriini (4,5 %) ja imidaklopridi (10 %)	Panta	Seresto	<i>Leishmania</i> -tartuntaa ehkäisevä	8 kuukautta	-	Otranto ym. 2013, Brianti ym. 2014, Brianti ym. 2016
Permetriini (50 %) + imidaklopridi (10 %)	Paikallisvaleyliuos	Bayvantic	Hietasääskiä karkottava, heikko tappoteho	Karkotus 3 viikkoa, (tappo 1 viikko)	24 tunnissa	Miró ym. 2007
Permetriini (50,5 %) + fiproniili (6,7 %)	Paikallisvaleyliuos	Frontect	Hietasääskiä karkottava ja tappava	Karkotus 4 viikkoa, tappo 4 viikkoa	24 tunnissa	Dumont ym. 2015

(jatkuu)

Taulukko 4. (jatkuu)

Vaikuttava aine	Muoto	Valmiste	Vaikutus	Vaikutuksen kesto	Teho saavutetaan	Lähde
Permetriini (36,08 %) + dinotefuraani (4,95 %) + pyriproksifeeni (0,44 %)	Paikallis-valeluliuos	Vectra 3D	Hietasääskiä karkottava ja tappava	Karkotus 4 viikkoa, tappo 2 viikkoa	24 tunnissa	Lienard ym. 2013
Permetriini (65 %)	Paikallis-valeluliuos	Exspot	Hietasääskiä karkottava ja tappava	Karkotus 3 viikkoa, tappo 2 viikkoa	24 tunnissa	Molina ym. 2012

2.7.1.1 Lääkepannat

Suomessa markkinoilla on tällä hetkellä kaksi lääkepannavaalmistetta, jotka ehkäisevät koiraa hietasääsken pistolta ja näin ollen suojaavat Leishmania-tartunnalta (Pharmaca Fennica Veterinaria 2018). Toisessa pannassa vaikuttavana aineena on deltametriini ja toisessa flumetriini sekä imidaklopridi (Miró ym. 2017). Sekä deltametriini että flumetriini ovat synteettisiin pyretroideihin kuuluvia hyönteismyrkkyjä. Synteettisten pyretroidien hyönteisiä tappava vaikutus perustuu niin sanottuun ”knock-down” -efektiin, jossa vaikuttavan aineen aiheuttama hyönteisen hermosolujen solukalvon natriumkanavien toimintahäiriö saa hyönteisessä aikaan shokkireaktion. Shokkireaktion vaikutuksesta hyönteinen lakkaa liikkumasta ja vaikuttaa kuolleelta. Mikäli hyönteisen tajunta palaa shokkireaktion jälkeen, sillä esiintyy pakkoliikkeitä ja vapinaa, jotka voivat johtaa hyönteisen kuolemaan (Beugnet ja Franc 2012). Hyönteisten natriumkanavat ovat vähintään 1000-kertaisesti herkempiä synteettisten pyretroidien vaikutuksille, kuin nisäkkäiden natriumkanavat. Tämän vuoksi synteettiset pyretroidit ovat koiralle yleensä turvallisia (Ensley 2012). Deltametriini ja flumetriini ovat haihtuvia molekyylejä, jonka vuoksi niillä on myös hyönteisiä karkottava vaikutus (Beugnet ja Franc 2012).

Deltametriinipannan deltametriini leviää rasvahakuisena aineena pannasta koiran ihon rasvaeritteisiin (Killick-Kendrick ym. 1997). Täydellinen teho saadaan kahdessa viikossa (Killick-Kendrick ym. 1997) ja hietasääskiä ehkäisevä teho säilyy 5–6 kuukauden ajan (Pharmaca Fennica Veterinaria 2018). Tutkimuksissa on havaittu deltametriinipannan estävän laskennallisesti 50,8–86 % hietasääskien välittämistä infektioista (Maroli ym 2001, Manzillo ym. 2006b, Brianti ym. 2016).

Imidaklopridi on neonikotinoideihin kuuluva hyönteismyrkky. Se sitoutuu hyönteisen hermosolujen nikotiiniasetyylikoliinireseptoreihin, mistä seuraa solukalvon pitkäaikainen depolarisaatio, natriumkanavien aukeaminen ja lopulta hermosolun kuolema. Flumetriinin ja imidaklopridin on havaittu toimivan yhdessä synergisesti vahvistaen toistensa toimintaa (Stanneck ym. 2012). Flumetriinia ja imidaklopridia vaikuttavana aineena sisältävän pannan tehoa Leishmania-tartuntaa vastaan on tutkittu kliinisissä kenttätutkimuksissa ja sen on havaittu estävän laskennallisesti 88,3–100 % hietasääsken välittämistä infektioista (Otranto ym. 2013, Brianti ym. 2014, Brianti ym. 2016). Vaikuttavat aineet vapautuvat pannasta tasaisella pitoisuudella koiran iholle (Stanneck ym. 2012). Dokumentoitua tietoa valmisteiden tehosta ehkäistä hietasääskien pistoja ei kuitenkaan ole saatavilla (Miró ym. 2017).

2.7.1.2 Paikallisvaleyliokset

Hietasääskiä karkottavissa paikallisvaleylioksissa voi vaikuttavana aineena olla pelkästään permetriiniä (Molina ym. 2012) tai permetriiniä yhdistettynä indoksakarbiin (Frenais ym. 2014), imidaklopridiin (Miró ym. 2007), fiproniiliin (Dumont ym. 2015) tai dinotefuraaniin ja pyriproksifeeniin (Lienard ym. 2013). Permetriiniä ja indoksakarbia sisältävää yhdistelmävalmistetta ei ole tällä hetkellä saatavilla Suomessa (Yliopiston apteekin asiakaspalvelu, suullinen tiedonanto 10/2018). Valmisteiden hietasääskiä tappava vaikutus perustuu usein permetriinin aiheuttamaan synteettisille pyretroideille tyypilliseen ”knock-down” -efektiin (Frenais ym. 2014). Haihtuvana molekyylinä permetriinillä on myös hyönteisiä karkottava vaikutus (Beugnet ja Franc 2012).

Imidaklopridi aiheuttaa hyönteisen kuoleman sitoutumalla hyönteisen hermosolujen nikotiiniasetyylikoliinireseptoreihin (Stanneck ym. 2012). Vaikka käsittely permetriiniä ja imidaklopridia sisältävällä valmisteella suositellaan uusittavan kolmen viikon välein, jotta karkottava teho säilyy korkeana (Miró ym. 2007), saattaa teho säännöllisesti annosteltuna säilyä myös neljän viikon välein annosteltuna (Otranto ym. 2007, Boushira ym. 2018). Endeemisellä alueella tehdyssä kenttätutkimuksessa valmisteeseen todettiin ehkäisevän Leishmania-tartuntaa tehokkaasti sekä kahden että neljän viikon välein annosteltuna. Kahden viikon välein annosteltuna valmiste esti tartunnan 90,4 %:lla ja neljän viikon välein annosteltuna 88,9 %:lla koirista (Otranto ym. 2007).

Permetriinin lisäksi myös fiproniililla on hyönteisiä tappava vaikutusmekanismi, joten näitä sisältävien valmisteiden hietasääskiä tappava teho on seurausta molemmista vaikuttavista aineista (Dumont ym. 2015). Normaalitilanteessa gamma-aminovoihappo (GABA) ja glutamaatti toimivat hermovälittäjäaineina, jotka estävät hyönteisen lihasaktiivisuutta sitoutumalla spesifisiin kloridikanavia avaaviin reseptoreihin. Fiproniili sitoutuu GABA- ja glutamaattireseptoreihin estäen kloridikanavien aukeamisen, jonka seurauksena hermosolun aktiivisuus lisääntyy voimakkaasti, mikä johtaa lopulta hyönteisen kuolemaan. (Beugnet ja Franc 2012). Valmisteiden hietasääskiä tappava vaikutus säilyy tasaisena kolmen viikon ajan, jonka jälkeen teho alenee hieman (Dumont ym. 2015, Franc ym. 2015). Laboratoriotutkimuksessa valmisteella, jossa permetriiniä on 50,5 % ja fiproniilia 6,7 % laskennallinen hietasääskiä karkottava teho neljä viikkoa valmisteeseen annostelusta oli 90,3 % ja hietasääskiä tappava teho 78,9 % (Dumont ym. 2015).

Permetriiniä, pyriproksifeeniä ja dinotefuraania sisältävän valmisteeseen teho perustuu todennäköisesti permetriinin ja dinotefuraanin yhdistelmään, sillä pyriproksifeenillä ei ole hietasääskiä karkottavaa eikä tappavaa vaikutusta (Lienard ym. 2013). Dinotefuraani kuuluu neonikotinoideihin, ja sen vaikutusmekanismi on samankaltainen kuin imidaklopridilla (Beugnet & Franc 2012).

2.7.2 Rokotteet

Tällä hetkellä Euroopassa on markkinoilla kaksi rokotetta koiran leishmanioosia vastaan, CaniLeish (Virbac) ja Letifend (MSD) (Miró ym. 2017). Rokotteilla on keskitetty myyntilupa EU:n alueella (Evira 2018) ja Suomessa ne ovat saatavilla Fimean erityisluvalla (Lääkelaki 395/1987 21f§). Nykyiset rokotteet eivät ehkäise tartuntaa, vaan ainoastaan vahvistavat koiran elimistön kykyä eliminoida tartunnan seurauksena elimistöön päässeet Leishmania-loiset. Koska tartunta ja kliininen sairastuminen ovat mahdollisia myös rokotetuilla koirilla, ei Leishmania-tartunnan ehkäisyn tulisi perustua pelkästään rokotteisiin (Miró ym. 2017).

CaniLeish-rokotteessa käytetään antigeenina puhdistettuja eritettyjä *L. infantumin* proteiineja (LiESAp) ja adjuvanttina puhdistettuja *Quillaja saponarian* eli suopapuun osasia (QA-21 saponiini) (Martin ym. 2014). Rokote voidaan antaa yli 6 kuukauden ikäisille seronegatiivisille koirille (Miró ym. 2017). Rokote annetaan kolme kertaa kolmen viikon välein, jonka jälkeen tehosterokote annetaan vuosittain (Moreno ym. 2014). Rokote saa aikaan spesifisten IgG2-tyyppin vasta-aineiden tuotannon sekä nopean ja tehostuneen Th1-tyyppin immuunivasteen (Moreno ym. 2012, Martin ym. 2014, Moreno ym. 2014). Th1-tyyppin immuunivasteelle on tyypillistä lisääntynyt lymfosyyttien gamma interferoni-sytokiinin tuotanto sekä tehostunut makrofagien toiminta Leishmania-loista vastaan. Tämän vaikutuksen on todettu säilyvän vuoden ajan ensimmäisen kolmen rokotteen sarjan antamisen jälkeen (Moreno ym. 2012, Moreno ym. 2014). Rokotteen on todettu kaksi hietasääsikautta kestäneessä kenttätutkimuksessa suojaavan koiraan aktiiviselta tartunnalta ja vähentävän kliinisiä oireita, mikäli koira saa tartunnan (Oliva ym. 2014). Rokotetut, mutta infektoituneet koirat ovat myös rokottamattomiin tartunnan saaneisiin verrattuna vähemmän infektiivisiä hietasääskille (Bongiorno ym. 2013). CaniLeish-rokotteen havaittuja haittavaikutuksia ovat injeksiokohdan paikalliset reaktiot, kuten turvotus, kovettuminen, palpaatiokipu ja punoitus (Oliva ym. 2014).

Letifend-rokote on adjuvantiton rokote, jossa on antigeenina *L. infantumin* proteiineista yhdistettyä rekombinantti proteiini Q:ta (Miró ym. 2017). Proteiini Q koostuu *L. infantumin* neljän proteiinin viidestä antigeenisestä osasta (Carcelén ym. 2009). Letifend-rokote voidaan antaa yli 6 kuukauden ikäisille seronegatiivisille koirille ja ensimmäisen rokotteen jälkeen tehosterokote annetaan vuosittain (Miró ym. 2017). Rokote aiheuttaa voimakkaan vasta-

ainetuotannon, jossa IgG2-tyyppin vasta-aineet vallitsevat. Rokotteen on todettu kokeellisessa tartunnassa vähentävän taudin kliinisiä oireita sekä ihon, pernan ja imusolmukkeiden loismäärää (Carcelén ym. 2009). Rokotteesta on aiheutunut vain vähän haittavaikutuksia ja yleisin haittavaikutus on itsestään muutamassa tunnissa ohimenevä pistokohdan lievä ärsytystila (Miró ym. 2017). Kaksi hietasääsikautta kestäneessä kenttätutkimuksessa rokotteen todettiin vähentävän kliinisen leishmanioosin esiintyvyyttä ja lievittävän oireita sairastuneilla. Lisäksi tutkimuksen mukaan rokote oli turvallinen myös seropositiivisille koirille, eikä pahentanut niillä sairautta (Cotrina ym. 2018). Letifend-rokote ei myöskään aiheuta virhepositiivisia tuloksia serologisissa diagnostisissa menetelmissä (Carcelén ym. 2009).

2.7.3 Domperidoni

Domperidoni tehostaa koiran luontaisia soluvälitteisiä immuunivasteita, minkä vuoksi koiran kyky eliminoida mahdollinen tartunta paranee. Terveillä seronegatiivisilla koirilla voidaan domperidonikuurin aikana havaita huomattava nousu aktivoituneiden neutrofiilien ja makrofagien määrässä (Sabaté ym. 2014). Domperidoni stimuloi neutrofiilien toimintaa terveillä koirilla jopa kuukauden ajan lääkityksen jälkeen (Gómez-Ochoa ym. 2012). Leishmanioosin ehkäisyssä domperidonia annostellaan 4 kuukauden välein 0,5 mg/kg kerran päivässä suun kautta 30 päivän ajan (Sabaté ym. 2014). Tutkimuksessaan Sabaté ym. (2014) havaitsivat, että domperidonilääkityksellä riski sairastua kliiniseen leishmanioosiin oli seitsemän kertaa alhaisempi kuin ilman lääkitystä. Domperidonin toimintamekanismi ja sivuvaikutukset on kuvattu kappaleessa 2.4.4

3 POHDINTA

Matkustelun ja tuontikoirien myötä *Leishmania*-tartunnat ja kliininen leishmanioosi yleistyvät myös Suomessa ja koska taudin oireet voivat olla hyvin epäspesifisiä, on tärkeää, että eläinlääkäri osaa epäillä tartuntaa. Naucke ym. (2008) esittävät, että yleisimmät oireet vaihtelevat sen mukaan, millä alueella tartunta on saatu, eli riippuen *L. infantum* kannasta. Tämä voi selittää taudin aiheuttamat vaihtelevat oireet. Ilmastonmuutoksen myötä voi myös olla vain ajan kysymys, koska Suomen ilmasto muuttuu hietasääskille sopivaksi. Koska merkittävin *Leishmania*-loisen tartuntatapa on vektorivälitteisesti hietasääsken välityksellä, voivat ilmaston lämpenemisen seurauksena tartunnat lisääntyä merkittävästi myös Suomessa. Jo nyt on Luoteis-Saksassa tavattu *P. perniciosus*-hietasääskiä, jotka voivat toimia vektorina *Leishmania*-loisille sekä *P. mascittii*-hietasääskiä, joiden epäillään voivan toimia vektorina (Naucke ja Schmitt 2004). Ei-endeemisillä alueilla myös muut, kuin vektorivälitteiset tartuntatavat saattavat olla merkittäviä. Koska *Leishmania*-loinen voi tarttua veneraalisesti astutuksen välityksellä ja vertikaalisesti emolta pennuille, olisikin tärkeää tutkia endeemisiltä alueilta tulevilta jalostukseen käytettäviltä koirilta leishmania-vasta-aineet ennen jalostuskäyttöä. Leishvet-tutkijaryhmä suosittelee, ettei endeemisiltä alueilta tulleita koiria käytettäisi jalostukseen tai verenluovutukseen ei-endeemisillä alueilla. (Miró, suullinen tiedonanto 10/2018)

Suomessa leishmanioosi kuuluu ilmoitettavaan eläintauteihin. Vuonna 2016 koko maassa Eviralle ilmoitettuja leishmanioositapauksia oli 5 kappaletta (Evira 2016) ja vuonna 2017 45 kappaletta (Evira 2017). Helsingin yliopistollisessa pieneläinsairaalaossa on Provet-potilasohjelmiston haun mukaan hoidettu 33:a leishmanioosia sairastavaa koiraa vuosina 2007–2017 (haku tehty 20.04.2018). Taudin todellista prevalenssia Suomessa ei kuitenkaan ole tutkittu, vaan se on todennäköisesti suurempi kuin ilmoitettu määrä.

Eläinlääkäriin tulisi osata myös ohjeistaa endeemisille alueille matkustavaa asiakasta koiran riittävästä suojautumisesta hietasääskiä vastaan. Tällä on merkitystä yksittäiselle koiralle ja lisäksi tartuntojen leviämisen kannalta tärkeintä on ennaltaehkäisy säännöllisesti käytettyjen hietasääskiä karkottavien ulkoloislääkkeiden avulla. Koska karkottavien valmisteiden teho ei ole riittävä heti valmisteen annostelun jälkeen, on muistettava annostella valmiste riittävän

ajoissa ennen matkaa. Deltametriinia käytettäessä on myös huomioitava, aineen on myrkyllisyys kissoille ja vesistöille (Ensley 2012). Osassa lähteistä ennaltaehkäisyn keinoksi ehdotetaan myös sairaiden koirien eutanasiaa ja muun muassa Brasiliassa on tehty tartunnan saaneiden koirien massalopetuksia. Tämä on kuitenkin tutkimuksissa todettu melko hyödyttömäksi tavaksi ehkäistä tartuntoja pitkällä aikavälillä, sillä taudin pitkän itämisajan vuoksi piileviä tartuntoja on paljon (Grimaldi ym. 2012). Ulkoloislääkkeiden lisäksi myös rokotukset voivat tulevaisuudessa olla avainasemassa tartunnan ehkäisyssä. Tällä hetkellä kehitetyt rokotteet eivät kuitenkaan ehkäise tartuntaa, vaan ainoastaan parantavat koiran immuunipuolustuksen kykyä taistella tartuntaa vastaan. Monissa tutkimuksissa rokotteiden tehoa on tutkittu kokeellisten tartuntojen avulla. Kokeellisessa tartunnassa koiralle annostellaan suuri määrä *Leishmania promastigootteja* suonensisäisesti. Tämä voi vääristää rokotteiden todellista tehoa, sillä luonnollisessa tartunnassa koiraan siirtyneiden promastigoottien määrä on huomattavasti pienempi ja lisäksi tartuntaan saattaa vaikuttaa myös muut tekijät, kuten hietasääsken piston aiheuttamat immuunireaktiot iholla. Luonnollisissa olosuhteissa koirat myös altistuvat hietasääskien pistoille useamman kerran, kun taas kokeellisessa tartunnassa altistus on kertaluontoinen. Eri rokotteiden vertailu on hankalaa, sillä niitä on tutkittu erilaisissa olosuhteissa. Rokotteiden todellisen tehon tutkiminen vaatii myös pitkäaikaistutkimuksia luonnollisissa olosuhteissa, mutta tällaisia tutkimuksia ei ole montaa. Todellisen tehon tutkiminen vaatii myös sen, että koirilla ei käytettäisi hietasääskiä karkottavia valmisteita tutkimusten ajan. Tehokas rokote olisi voimakkaan soluvälitteisen immuunivasteen aiheuttava ja suojaisi sekä tartunnalta että ehkäisisi tehokkaasti taudin etenemistä. Lisäksi sillä tulisi olla mahdollisimman vähän haittavaikutuksia. Mikäli rokotteet kehittyvät tulevaisuudessa paremmaksi, voidaan niiden avulla mahdollisesti ehkäistä paljon koirien ja sen kautta myös ihmisten *Leishmania*-tartuntoja.

*Leishmania*osin diagnostiikka perustuu epäilyyn tartunnasta, sopiviin oireisiin sekä diagnostisiin menetelmiin. Diagnostisten menetelmien vertailu on hankalaa, sillä eri menetelmillä on omat hyvät ja huonot puolensa. Diagnostisia menetelmiä tulisikin käyttää yhdistellen tilanteen mukaan. Terveiden koirien vuotuiseseen testaamiseen sopivat hyvin serologiset testit, mutta mikäli eläinlääkärillä on epäily mahdollisesta *leishmania*ositarunnasta, saattaa eri menetelmiä joutua yhdistelemään diagnoosin

varmistamiseksi. Diagnostisia menetelmiä on tutkittu paljon, mutta tutkimusten vertailu on hankalaa, sillä tutkimuksissa ei ole yhtenäisiä rajoja oireiden vakavuudelle. Eri tutkimustulokset on siis saatu eriasteisesti oireilevilla koirilla. Osassa tutkimuksia koirat on jaettu oireettomiin, vähäoireisten ja oireilevien luokkiin, kun taas toisissa ainoastaan oireettomiin ja oireileviin. Lisäksi tutkimukset on yleensä tehty endeemisillä alueilla, millä saattaa olla vaikutusta tutkimustuloksiin. Esimerkiksi positiivinen PCR-tutkimustulos ei yksin riitä todistamaan koiran saaneen tartunnan, sillä positiivinen tulos voidaan saada myös tilanteessa, jossa koiran elimistö on torjunut tartunnan. Pitkäaikaistutkimuksia on melko vähän, ja niiden tuloksiin voi vaikuttaa myös sen hetkisen ilmaston vaikutus hietasääskien vuotuisen esiintyvyyteen.

Vaikka kliinisen leishmanioosin hoitoon on olemassa hoitosuosituksia, voi taudin hoito silti olla hankalaa ja hoito voidaan tehdä monella tavoin. Lisähaasteen hoidolle antaa Leishmania-loisilla havaittu resistenssi lääkkeitä vastaan, sekä WHO:n suositus olla käyttämättä ihmisille tarkoitettuja lääkkeitä, kuten miltefosiinia ja meglumiiniantimoniaattia. Käytännössä myös ihmisillä käytettyjä lääkkeitä kuitenkin käytetään koiran leishmanioosin hoidossa ja koiran leishmanioosin hoidosta annetut suositukset suosittelevat näiden lääkkeiden käyttöä. Jos tauti saadaan todettua varhaisessa vaiheessa, on sitä mahdollista hoitaa onnistuneesti pelkällä allopurinolilla ja/tai domperidonilla. Tässä korostuu jälleen eläinlääkärin kyky epäillä tartuntaa jo taudin aikaisessa vaiheessa. Lieväoireisissa tautitapauksissa domperidonin käyttö voi olla hyödyllistä, sillä sen vaikutusmekanismi on koiran oman immuunipuolustuksen parantaminen. Myös uusia, immuunipuolustukseen vaikuttavia lääkkeitä on kehitteillä ja niistä on saatu melko lupaavia tutkimustuloksia, mutta lisätutkimusta ja -kehitystä vaaditaan vielä paljon (Viana ym. 2018). Koska lääkityksellä vain harvoin saadaan aikaan niin sanottu parasitologinen paraneminen, eli loisen täydellinen eliminoituminen elimistöstä, olisi uusien tehokkaiden lääkkeiden kehitys tutkijoiden tavoitteena. Parasitologinen paraneminen voi kuitenkin olla vaikea todistaa. Lisäksi parasitologinen paraneminen ei ehkäise koiraa saamasta uutta tartuntaa. Tehokkaalla lääkityksellä voidaan kuitenkin vähentää koiran infektiivisyyttä hietasääskille, millä voi olla suurta merkitystä taudin leviämisen kannalta. Myöskään hoidosta ei ole monia pitkäaikaistutkimuksia, joten tutkimustietoa siitä kuinka monella koiralla sairaus puhkeaa myöhemmin uudestaan, on vain vähän. Lisäksi koiran vastetta hoitoon on hyvin vaikea ennustaa. Uusien, vain eläimille tarkoitettujen lääkkeiden kehitys olisi tärkeää myös

lääkeresistenssin vuoksi, sillä näin voitaisiin vähentää ihmisille käytettäville lääkkeille resistenttien loiskantojen syntyä.

Koska kyseessä on elinikäinen sairaus, olisi tärkeää pystyä antamaan sairastuneelle koiralle jonkinlainen ennuste. Ennusteen antaminen voi kuitenkin olla hyvin hankalaa, sillä sairauden kehitys on eri koirilla erilainen ja lisäksi koirat vastaavat hoitoon eri tavoin. LeishVet- ja CLWG-tutkijaryhmien mukaiset leishmanioosin luokittelut voivat antaa viitteitä ennusteen antamiseen. Koirien tarkka luokittelu voi kuitenkin olla välillä haastavaa, sillä leishmanioosi aiheuttaa hyvin erilaisia muutoksia eri koirille. LeishVet-ryhmän suosituksissa on annettu tarkat munuaisten toimintaan perustuvat raja-arvot, kun taas CLWG-ryhmä antaa suurpiirteisemmät ohjeet luokitteluun. Luokittelu on siis helpompaa CLWG-ryhmän mukaisella luokittelulla, mutta tarkempaa LeishVet-ryhmän luokittelulla.

4 LÄHDELUETTELO

Alexandre-Pires G, de Brito M, Algueró C, Martins C, Rodrigues O, da Fonseca I, Santos-Gomes G. Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Vet Immunol Immunop* 2010, 137:275—283.

Baneth G & Shaw S. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2002, 106:315—324.

Baneth G, Koutinas A, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: Part one. *Trends Parasitol* 2008, 24:324—330.

Baneth G, Bourdeau P, Cardoso C, Ferrer L, Miró G, Oliva G, Pennisi MG, Petersen C, Solano-Gallego L. Canine and feline leishmaniosis. A brief for the practicing veterinarian.

<http://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2018/09/EN-Guidelines.pdf>, haettu 24.10.2018, päivitetty 09.2018.

Barrouin-Melo S, Larangeira D, de Andrade Filho F, Trigo J, Julião F, Franke C, Palis Aguiar P, dos-Santos W, Pontes-de-Carvalho L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet J* 2006, 171:331—339.

Bartges JW, Osborne CA, Lulich JP, Kruger JM, Sanderson SL, Koehler LA, Ulrich LK. Canine urate urolithiasis - Etiopathogenesis, diagnosis, and management. *Vet Clin N Am-Small* 1999, 29:161—191.

Bates P. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007, 37:1097—1106.

Belinchón-Lorenzo S, Iniesta V, Parejo C, Fernández-Cotrino J, Muñoz-Madrid R, Soto M, Alonso C, Nieto L. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2013, 192:43—50.

Best M, Ash A, Bergfeld J, Barrett J. The diagnosis and management of a case of leishmaniosis in a dog imported to Australia. *Vet Parasitol* 2014, 202:292—295.

Beugnet F & Franc M. Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. *Trends Parasitol* 2012, 28:267—279.

Bianciardi P, Brovida C, Valente M, Aresu L, Cavicchioli L, Vischer C, Giroud L, Castagnaro M. Administration of Miltefosine and Meglumine Antimoniate in Healthy Dogs: Clinicopathological Evaluation of the Impact on the Kidneys. *Toxicol Pathol* 2009, 37:770—775.

Bongiorno G, Papparcone R, Manzillo VF, Oliva G, Cuisinier AM, Gradoni L. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs—A preliminary xenodiagnosis study. *Vet Parasitol* 2013, 197:691—695.

Boucekoua M, Trabelsi S, Ben Abdallah T, Khaled S. Visceral leishmaniasis after kidney transplantation: Report of a new case and a review of the literature. *Transplant Rev* 2014, 28:32—35.

Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunop* 1997, 59:21—30.

Bouhsira E, Deuster K, Lienard E, Le Sueur C, Franc M. Evaluation of the anti-feeding and insecticidal effects of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin (Advantix (R)) against *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* (Newstead, 1911) in dogs following monthly administration. *Parasite Vector* 2018, 11:120.

Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Basano FS, Latrofa MS, Tarallo VD, Dantas-Torres F, Capelli G, Stanneck D, Giannetto S, Otranto D. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. *Parasite Vector* 2014, 7:327.

Brianti E, Napoli E, Gaglio G, Falsone L, Giannetto S, Basano FS, Nazzari R, Latrofa MS, Annoscia G, Tarallo VD, Stanneck D, Dantas-Torres F, Otranto D. Field Evaluation of Two Different Treatment Approaches and Their Ability to Control Fleas and Prevent Canine Leishmaniosis in a Highly Endemic Area. *Plos Neglect Trop D* 2016, 10: e0004987.

Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular Characterization of a Kinesin-Related Antigen of *Leishmania-Chagasi* that Detects Specific Antibody in African and American Visceral Leishmaniasis. *P Natl Acad Sci Usa* 1993, 90:775—779.

Cantos-Barreda A, Escribano D, Ceron JJ, Tecles F, Bernal LJ, Martinez-Subiela S. Changes in the concentration of anti-*Leishmania* antibodies in saliva of dogs with clinical leishmaniosis after short-term treatment. *Vet Parasitol* 2018, 254:135—141.

Carcelén J, Iniesta V, Fernández-Cotrino J, Serrano F, Parejo JC, Corraliza I, Gallardo-Soler A, Marañón F, Soto M, Alonso C, Gómez-Nieto C. The Chimerical Multi-Component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine* 2009, 27:5964—5973.

Ciaramella P, Oliva G, De Luna R, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 1997, 141:539—543.

Cortadellas O. Initial and Long-Term Efficacy of a Lipid Emulsion of Amphotericin B Desoxycholate in the Management of Canine Leishmaniasis. *J Vet Intern Med* 2003, 17:808–812.

Cortes S, Vaz Y, Neves R, Maia C, Cardoso L, Campino L. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol* 2012, 189:189–196.

Cortese L, Sica M, Piantedosi D, Ruggiero G, Pero ME, Terrazzano G, Mastellone V, Ciaramella P. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 2009, 164:778–782.

Costa FAL, Goto H, Saldanha LCB, Silva SMMS, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol* 2003, 40:677–684.

Coutinho MTZ & Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. *Vet Parasitol* 2007, 147:320–325.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, de Maria M, Genaro O, Linardi PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2005, 128:149–155.

Cringoli G, Rinaldi L, Capuano F, Baldi L, Veneziano V, Capelli G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Vet Parasitol* 2002, 106:307–313.

Cruz I, Morales MA, Nogueira I, Rodriguez A, Alvar, J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 2002, 359: 1124–1125.

da Silva DA, Madeira MD, Abrantes TR, Barbosa CJD, Figueiredo FB. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet J* 2012, 195:252–253.

Dantas-Torres F, da Silva Sales KG, Gomes da Silva L, Otranto D, Figueredo LA. *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. *Mol Cell Probe* 2017, 31:65–69.

Dantas-Torres F, Sales KGS, da Silva LG, Otranto D, Figueredo LA. Level of agreement between two commercially available rapid serological tests and the official screening test used to detect *Leishmania* seropositive dogs in Brazil. *Vet J* 2018, 234:102–104.

de Freitas JCC, Nunes-Pinheiro DCS, Neto BEL, Santos GJL, de Abreu CRA, Braga RR, Campos RD, de Oliveira LF. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012, 45:24–29.

de Queiroz NMGP, da Silveira RCV, de Noronha ACF, Oliveira TMFS, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Vet Parasitol* 2011, 178:1–8.

De Tommasi AS, Otranto D, Furlanello T, Tasca S, Cantacessi C, Breitschwerdt EB, Stanneck D, Dantas-Torres F, Baneth G, Capelli G, de Caprariis D. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. *Parasite Vector* 2014, 7:534.

Denerolle P & Bourdoiseau G. Combination Allopurinol and Antimony Treatment versus Antimony Alone and Allopurinol Alone in the Treatment of Canine Leishmaniasis (96 Cases). *J Vet Intern Med* 1999, 13:413—415.

Dey A & Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbi* 2006, 24:165—170.

DiBartola SP & Westropp JL. Urinary tract disorders. Teoksessa: Nelson RW, Couto CG (toim.). *Small animal internal medicine*. 5. p. Elsevier, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat 2014. 629—712.

Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol* 2005, 42:650—658.

Dumont P, Fankhauser B, Bouhsira E, Lienard E, Jacquiet P, Beugnet F, Franc M. Repellent and insecticidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against the main vector of canine leishmaniasis in Europe (*Phlebotomus perniciosus*). *Parasite Vector* 2015, 8:49.

Eläintautilaki 441/2013, 15-16§. <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2013/20130441>, haettu 15.6.2018.

Ensley SM. Pyrethrins and pyrethroids. Teoksessa: Gupta RC (toim.) *Veterinary Toxicology - Basic and Clinical Principles*. 2. p. Academic Press, Boston, Yhdysvallat 2012. 591—595.

ESCCAP 2012. European scientific counsel companion animal parasites: Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats. https://www.esccap.org/uploads/docs/ih38c2d6_ESCCAP_Guidelines_GL5_01Oct2012.pdf, haettu 9.4.2018.

Evira 2016. 2016 Eläintaudit kuukausittain. <https://www.evira.fi/globalassets/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/elaintaudit-2016-kuukausittainen-yhteenvento.pdf>, haettu 13.11.2018.

Evira 2017. Eläintaudit kuukausittain 1.1.-31.12.2017. <https://www.evira.fi/globalassets/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/elaintaudit-1.1.-31.12.2017-kuukausittain.pdf>, haettu 13.11.2018.

Evira 2018. Pieneläimille hyväksytyt lääkevalmisteet. https://www.evira.fi/globalassets/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/laakitseminen/laakeluettelot/pienelaimet_valm.pdf, haettu 23.10.2018, päivitetty 02.02.2018.

Ferreira SD, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, Fujiwara RT, de Andrade ASR, Melo MN. Canine Skin and Conjunctival Swab Samples for the Detection and Quantification of *Leishmania infantum* DNA in an Endemic Urban Area in Brazil. *Plos Neglect Trop D* 2012, 6:e1596.

Ferreira SD, Almeida GG, Silva SD, Vogas GP, Fujiwara RT, de Andrade ASR, Melo MN. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. *Plos Neglect Trop D* 2013, 7:e2150.

Ferrer L. The pathology of canine leishmaniasis. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain 2002: 21–24.

Fimea 2018. Eriytyislupavalmisteet eläinlajeittain.

https://www.fimea.fi/documents/160140/761379/ERITYISLUPAVALMISTEET+EL%C3%84INLAJEITTAIN+korj_2018-09-30.xls/f250eb7b-e533-bd4f-d4a7-703d95dcb607, haettu

11.10.2018.

Franc M, Liénard E, Jacquet P, Bonneau S, Navarro C, Bouhsira E. Efficacy of a new combination of fipronil and permethrin (Effitix®) against *Phlebotomus perniciosus* in dogs. *Vet Parasitol* 2015, 212:156–160.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2006, 137:214–221.

Frenais R, Flochlay-Sigognault A, Milon-Harnois G. Anti-feeding efficacy of Activyl® Tick Plus topical treatment of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Parasite Vector* 2014, 7:217.

Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E, Molina R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol* 2010, 169:327–334.

Garcia-Alonso M, Blanco A, Reina D, Serrano FJ, Alonso C, Nieto CG. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1996, 18:617–623.

García-Martínez JD, Martínez-Subiela S, Tvarijonavičiute A, Caldin M, Ceron JJ. Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Res Vet Sci* 2015, 99:204–207.

Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunop* 2008, 121:23–33.

Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *Vet J* 2009, 179:259–263.

Gómez-Ochoa P, Sabaté D, Homedes J, Ferrer L. Efficacy of Domperidone for the Treatment of Mild and Moderate Cases of Canine Leishmaniosis: Clinical and Immunological Short-Term Follow-Up. Proceedings of the 21st ECVIM-CA Congress, Sevilla, Spain 2011: 215.

Gómez-Ochoa P, Sabate D, Homedes J, Ferrer L. Use of the nitroblue tetrazolium reduction test for the evaluation of Domperidone effects on the neutrophilic function of healthy dogs. Vet Immunol Immunop 2012, 146:97—99.

González JL, Rollán E, Novoa C, Castaño M. Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. Histol Histopathol 1988, 3:323—329.

Grimaldi G, Teva A, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. Am J Trop Med Hyg 2012, 86:966—971.

Hill's 2018. Prescription Diet™ Canine u/d™.

<https://www.hillspet.fi/dog-food/pd-canine-prescription-diet-ud-dry>, haettu 1.8.2018.

Holzmuller P, Cavaleyra M, Moreaux J, Kovacic R, Vincendeau P, Papierok G, Lemesre JL. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. Vet Immunol Immunop 2005, 106:247—257.

Hosein S, Blake DP, Solano-Gallego L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. Parasitology 2017, 144:95-115.

IRIS 2016. International renal interest society: IRIS staging of CKD (modified 2017).

http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf, haettu 15.7.2018, päivitetty 2017.

Kalyuzhny AE. Immunohistochemistry: essential elements and beyond. Springer International Publishing Switzerland 2016. 1—28.

Karkamo V, Kaistinen A, Näreaho A, Dillard K, Vainio-Siukola K, Vidgren G, Tuoresmaki N, Anttila M. The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. Acta Vet Scand 2014, 56: 84.

Kasap OE & Alten B. Laboratory estimation of degree-day developmental requirements of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). J Vector Ecol 2005, 30: 328-333.

Kasap OE & Alten B. Comparative demography of the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) at constant temperatures. J Vector Ecol 2006, 31:378—385.

Kegler Pangrazio K, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, Costa LF, Dengues EG, Diaz AAR, Santos RL. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. Vet Parasitol 2009, 165:327—331.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1997, 11:105—111.

Koch LK, Kochmann J, Klimpel S, Cunze S. Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe. *Sci Rep* 2017, 7:13325.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J A Anim Hosp Assoc* 1999, 35:376—383.

Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N, Papadopoulos O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2001, 98: 247-261.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006, 27:95—125.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002, 40:210—215.

Lamothe J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 2001, 42:170—175.

Laurenti MD, Leandro MVD, Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF, Silva RM, Marcondes M, da Matta VLR. Comparative evaluation of the DPP (R) CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2014, 205:444—450.

Levy E, Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Polizopoulou ZS, Psychogios V, Koutinas AF. Nasal and oral masses in a dog. *Vet Clin Path* 2006, 35:115—118.

Liénard E, Bouhsira E, Jacquiet P, Warin S, Kaltsatos V, Franc M. Efficacy of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on on dogs against *Phlebotomus perniciosus* and *Ctenocephalides canis*. *Parasitol Res* 2013, 112: 3799-3805.

Lopez R, Lucena R, Novales M, Ginel PJ, Martin E, Mollada JM. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *J Vet Med B* 1996, 43:469—474.

Lääkeläki 395/1987, 21f§. <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1987/19870395#L4P21f>, haettu 11.11.2018.

Maia C & Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 2008, 158:274—287.

- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Goncalves L, Campino, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 2009, 179:142—144.
- Majumder B, Biswas R, Chattopadhyay U. Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. *Int J Cancer* 2002, 97:493—500.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Della Morte R, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2004, 125:251-262.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 2008, 177:279—282.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, Gravino AE. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Vet J* 2009, 182:441—445.
- Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P, Gravino AE. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasite Vector* 2015, 8: 289.
- Manzillo VF, Restucci B, Pagano A, Gradoni L, Oliva G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Vet Rec* 2006a, 158: 690-694.
- Manzillo VF, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet Parasitol* 2006b, 142:142—145.
- Marcondes M, Biondo AW, Gomes AAD, Silva ARS, Vieira RFC, Camacho AA, Quinn J, Chandrashekarg R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet Parasitol* 2011, 175:15—19.
- Maroli M, Mizzoni V, Siragusa C, D'Orazi A, Gradoni L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol* 2001, 15: 358-363.
- Martin V, Vouldoukis I, Moreno J, McGahie D, Gueguen S, Cuisinier AM. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Vet Res* 2014, 45:6.
- Martínez-Moreno A, Martínez-Cruz MS, Blanco A, Hernández-Rodríguez S. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 1993, 51:49—59.

Martínez-Subiela S, Bernal LJ, Ceroón JJ. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am J Vet Res* 2003, 64:1021—1026.

Martínez-Subiela S, García-Martínez JD, Tvarijonaviciute A, Tecles F, Caldin M, Bernal LJ, Cerón JJ. Urinary C reactive protein levels in dogs with leishmaniasis at different stages of renal damage. *Res Vet Sci* 2013, 95:924—929.

Mateo M, Maynard L, Vischer C, Bianciardi P, Miró G. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. *Parasitol Res* 2009, 105:155—162.

Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics* 1999, 104:e65.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. 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* 2005, 43:5515—5519.

Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L, Ramis A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Res Vet Sci* 2008, 85:35—38.

Miró G & López-Vélez R. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Vet Parasitol* 2018, 254:151—159.

Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA, Molina R. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet Parasitol* 2007, 143: 375—379.

Miró G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, Mortarino M, Vischer C, Bianciardi P. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol* 2009, 20: 397—404.

Miró G, Gálvez R, Fraile C, Descalzo MA, Molina R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasite Vector* 2011, 4:52.

Miró G, Petersen C, Cardoso L, Bourdeau P, Baneth G, Solano-Gallego L, Pennisi MG, Ferrer L, Oliva G. Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis. *Trends Parasitol* 2017, 33:718—730.

MMM 1010/2013, 9§. Maa- ja metsätalousministeriön asetus eläintautien ilmoittamisesta ja mikrobikantojen toimittamisesta. <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2013/20131010>, haettu 15.6.2018

Molina R, Espinosa-Góngora C, Gálvez R, Montoya A, Descalzo MA, Jiménez MI, Dado D, Miró G. Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. *Vet Parasitol* 2012, 187:529—533.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 2007, 145:245—252.

Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM, Gueguen S. Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. *Plos Neglect Trop D* 2012, 6: e1683.

Moreno J, Vouldoukis I, Schreiber P, Martin V, McGahie D, Gueguen S, Cuisinier AM. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. *Vet Immunol Immunop* 2014, 158:199-207.

Mylonakis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Path* 2005, 34:243—247.

Naucke TJ & Schmitt C. Is leishmaniasis becoming endemic in Germany? *Int J Med Microbiol* 2004, 293:179—181.

Naucke TJ, Menn B, Massberg D, Lorentz S. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res* 2008, 103:65—68.

Naucke TJ, Amelung S, Lorentz S. First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasite Vector* 2016, 9:256.

Nicolato RD, de Abreu RT, Roatt BM, Aguiar-Soares RDD, Reis LES, Carvalho MD, Carneiro CM, Giunchetti RC, Bouillet LEM, Lemos DS, Coura-Vital W, Reis AB. Clinical Forms of Canine Visceral Leishmaniasis in Naturally *Leishmania infantum*-Infected Dogs and Related Myelogram and Hemogram Changes. *Plos One* 2013, 8:e82947.

Noli C & Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet J* 2014, 201:425—435.

O'Connor TP. SNAP Assay Technology. *Top Companion Anim M* 2015, 30:132—138.

OIE 2018. World organization for animal health: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018.

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_LEISHMANIOSIS.pdf, haettu 20.1.2018, päivitetty 5.2014.

Oliva G, Scalone A, Manzillo VF, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. 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. *J Clin Microbiol* 2006,44:1318—1322.

Oliva G, Nieto J, Manzillo VF, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, Scalone A, Moreno J, Chicharro C, Carrillo E, Butaud T, Guegand L, Martin V, Cuisinier AM, McGahie D, Gueguen S, Cañavate C, Gradoni L. A Randomised, Double- Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naive Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons. *Plos Neglect Trop D* 2014, 8: e3213.

Ordeix L, Dalmau A, Osso M, Llull J, Montserrat-Sangrà S, Solano-Gallego L. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. *Parasite Vector* 2017, 10: 121.

Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R, Brandonisio O. Rapid Immunochromatographic Test for Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2004, 42:2769—2770.

Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G, Stanneck D. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniosis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet Parasitol* 2007, 144:270—278.

Otranto D, Dantas-Torres F, de Caprariis D, Di Paola G, Tarallo V, Latrofa M, Lia R, Annoscia G, Breitshwerdt E, Cantacessi C, Capelli G, Stanneck D. Prevention of Canine Leishmaniosis in a Hyper-Endemic Area Using a Combination of 10% Imidacloprid/4.5% Flumethrin. *Plos One* 2013, 8: e56374.

Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Javma-J Am Vet Med A* 2001, 219:1076—1083.

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Javma-J Am Vet Med A* 2010, 236:1184—1191.

Paltrinieri S, Gradoni L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Path* 2016, 45:552—578.

Pennisi MG, Reale S, Lo Giudice S, Masucci M, Caracappa S, Vitale M, Vitale F. Real-Time PCR in Dogs Treated for Leishmaniasis with Allopurinol. *Vet Res Commun* 2005, 29:301—303.

Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Sarldomichelakis MN, Leontides LS, Mischke R, Diniz P, Breitschwerdt EB, Kritsepi M, Garipidou VA, Koutinas CK, Lekkas S. Factors Associated with the Occurrence of Epistaxis in Natural Canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 2008, 22:866—872.

Pharmaca Fennica Veterinaria. Lääketietokeskus Oy, Helsinki, Suomi 2018.

Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, Papazoglou LG, Saridomichelakis MN, Savvas I, Leondides L. Effects of Allopurinol Treatment on the Progression of Chronic Nephritis in Canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*). J Vet Intern Med 2006, 20:228—233.

Plumb DC. Allopurinol. Teoksessa: Plumb DC (toim.) Plumb's Veterinary Drug Handbook. 9. p. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, Yhdysvallat 2018. 47—49.

Proverbio D, Spada E, Perego R, de Giorgi GB. Seizures as a Consequence of Hyperviscosity Syndrome in Two Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. J Am Anim Hosp Assoc 2016a, 52:119—123.

Proverbio D, Spada E, Perego R, Baggiani L, De Giorgi GB, Migliazzo A, Vitale F. Comparison of a rapid immunochromatographic assay with an immunofluorescent antibody test for detection of *Leishmania infantum* antibodies in dogs. Vet Clin Path 2016b, 45:623—626.

Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. J Comp Path 1991, 105:279—286.

Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. Immunogenetics 2003, 55:23—28.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. Res Vet Sci 2006, 81:68—75.

Richards SM, Garman RD, Keyes L, Kavanagh B, McPherson JM. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. Cell Immunol 1998, 184 85—91.

Rodríguez-Cortés A, Fernández-Bellón H, Ramis A, Ferrer L, Alberola J, Solano-Gallego L. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunop 2007, 116:190—198.

Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. J Parasitol 2005, 91:970—972.

Roura X, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Maroli M, Oliva G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. Vet J 2013, 198:43—47.

Royal Canin 2018. Urinary U/C UUC 18 Low purine.

<https://www.royalcanin.fi/tuotteet/tuotteet/ruoat-elaeklinikoilla/vet-diet-canine/urinary-u-c-uuc-18-low-purine>, haettu 1.8.2018.

Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M, Ferrer L. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Prev Vet Med* 2014, 115:56—63.

Sanchez MA, Diaz NL, Zerpa O, Negron E, Convit J, Tapia FJ. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: Analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2004, 70:618—624.

Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic. *Am J Trop Med Hyg* 2005, 73:82—86.

Sasanelli M, Paradies P, de Caprariis D, Greco B, De Palo P, Palmisano D, Carelli G. Acute-phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol. *Vet Res Commun* 2007, 31:335—338.

Shetty N. *Immunology: Introductory Textbook*. 2. p. New Age International (P) Ltd., New Delhi, India 2005. 50—69.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2009, 160:55—59.

Slappendel RJ. Canine Leishmaniasis - a Review Based on 95 Cases in the Netherlands. *Vet Quart* 1988,10:1—16.

Slimane TB, Chouih E, Ahmed SBH, Chelbi I, Barhoumi W, Cherni S, Zoghalmi Z, Gharbi M, Zhioua E. An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected dogs and assessment of offspring's infectiousness potential by xenodiagnosis. *Vet Parasitol* 2014, 206:282—286.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 2000, 90:37—45.

Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2007, 147:315—319.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2009, 165:1—18.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasite Vector* 2011, 4: 86.

Solano-Gallego L, Villanueva-Saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T, Natale A. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan[®], ID Screen[®] and Leishmania 96[®]), a rapid test (Speed Leish K[®]) and an in-house IFAT. *Parasite Vector* 2014, 7: 11.

Stanneck D, Ebbinghaus-Kintscher U, Schoenhense E, Kruedewagen EM, Turberg A, Leisewitz A, Jiritschka W, Krieger KJ. The synergistic action of imidacloprid and flumethrin and their release kinetics from collars applied for ectoparasite control in dogs and cats. *Parasite Vector* 2012, 5: 73. doi: 10.1186/1756-3305-5-73

Sundar S & Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immun* 2002, 9:951—958.

Sykes J, Baneth G, Petersen C. Leishmaniosis. Teoksessa: Sykes J (toim.) *Canine and feline infectious diseases*. Elsevier, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat 2014. 713—726.

Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN, Tafuri, WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol* 2001, 96:203—212.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Sandflies. Teoksessa Taylor MA, Coop RL, Wall RL (toim.) *Veterinary Parasitology*. 3. p. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, Yhdysvallat 2007. 761—762.

Tizard I. Immunodiagnostic Techniques. Teoksessa Tizard I (toim.) *Veterinary Immunology*. 9. p. Elsevier, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat 2013. 494—514.

Toplu N & Aydogan A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. *Parasitol Res* 2011, 109:1051—1057.

Torres M, Bardagí M, Roura X, Zanna G, Ravera I, Ferrer L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 2011, 188:346—351.

Tvarijonaviciute A, Ceron JJ, Martinez-Subiela S, García-Martinez JD. Serum and urinary adiponectin in dogs with renal disease from leishmaniasis. *Vet Rec* 2012, 171:297—U47.

Uhari M. Diagnostisten testien tunnusluvut ja niiden käyttö. *Duodecim lääketieteellinen aikakauskirja* 2004, 120:935—941.

van Griensven J & Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin N Am* 2012, 26:309—322.

Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec* 2000, 146:698—703.

Verma NK & Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Ch* 2004, 48:3010—3015.

Viana KF, Lacerda G, Teixeira NS, Cangussu ASR, Aguiar RWS, Giunchetti RC. Therapeutic vaccine of killed *Leishmania amazonensis* plus saponin reduced parasite burden in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 2018, 254:98—104.

Viegas C, Requicha J, Albuquerque C, Sargo T, Machado J, Dias I, Pires MA, Campino L, Cardoso L. Tongue nodules in canine leishmaniosis - a case report. *Parasite Vector* 2012, 5: 120.

Viñuelas J, García-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Mirón C, Carcelén J, Alonso C, Nieto CG. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 2001, 101:23—27.

von Lode P. Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clin Biochem* 2005, 38:591—606.

World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010. WHO Technical Report Series 2010, 949.

Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, Tafuri WL, Tafur WL. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *Bmc Vet Res* 2006, 2:17.

Yasur-Landau D, Jaffe CL, David L, Baneth G. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. *Plos Neglect Trop D* 2016, 10: e0004341.