

Лайшманиоза при кучета и хора в България

Научно становище

Проф.д-р Илия Цачев

Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора

Лайшманиозите са векторно-преносими протозойни заболявания. В България най-честата форма на проявление е висцералната лайшманиоза - от нея боледуват и хората и животните. При хората първоначално тя е установена като неавтохтонна лайшманиоза през 1921 г., а като автохтонна през 1937 г. от Моллов В. (Груев, 1949); през последните 25 години се регистрира ежегодно (Харизанов, 2012). При кучетата от 2006 г., когато са доказани и първите два клинични случаи при ротвайлери от град Петрич (Цачев, 2010), ежегодно също бива установявана (Цачев, 2015).

С акцент България, при кучетата лайшманиозата е представена със съвременната си етиологична и актуална нозогеографска характеристика - по държави, райони и години. Описани са клиничните симптоми, хематологичните и биохимични промени, морфологичните находки. Отделено е специално внимание на диагностичните методи и подхода към болните животни. Разгледани са терапевтичните възможности и профилактичните мерки срещу *L.infantum*.

При хората лайшманиозата в България е представена от гледна точка на ветеринарното обществено здраве – нозогеография заболяемост, леталитет и клинични случаи.

Причинителите на лайшманиозата са протозои, принадлежащи към род *Leishmania*, които инвазират голям брой гръбначни животни, включително кучето и човека.

Клиничните критерии за категоризиране на лайшманиозата при човека (доскоро използвани и във ветеринарната медицина) определят 3 форми на заболяването – висцерална, кутанна и муко-кутанна. При кучето най-честа е висцералната, при която се срещат и кожни промени и поради това някои автори считат за по-правилно да се говори за генерализирана лайшманиоза (Kontos and Koutinas, 1993; Kontos, 2002; Gállego, 2004), европейска кучешката лайшманиоза (Carlotti, 2003) или зоонозна висцерална лайшманиоза (Antoniou et al., 2008).

Етиология. Лайшманиите са облигатни интрацелуларни протозои от род *Leishmania*, принадлежащи към семейство Trypanosomatidae, разред Kinetoplasta, клас Zoomastigophorea, царство Protista. Те включват (CDC, 2008):

- *L. donovani* complex - с 3 вида
(*L. donovani*, *L. infantum* и *L. chagasi*)
- *L. mexicana* complex - с 3 вида
(*L. mexicana*, *L. amazonensis* и *L. venezuelensis*)
- *L. tropica* complex - с 3 вида

(*L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*)

- суброд *Viannia* - с 4 вида
(*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* и *L. (V.) peruviana*).
-

Отделните видове морфологически не се различават. Те могат да бъдат диференцирани с изoenзимен анализ, молекулярни методи или моноклонални антитела.

Патогенните видове лайшмании за Северна и Южна Америка (Новия свят) включват:

- *L. braziliensis* complex

(*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*)

- *L. mexicana* complex

(*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*)

- *L. peruviana*

- *L. chagasi*

Патогенните видове за Европа и Азия (Стария свят) са:

- *L. donovani*

- *L. infantum*

- *L. tropica* complex

(*L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*) (^a OIE, 2004)

Видовете предизвикващи лайшманиозата при кучето са: *L. infantum*, *L. chagasi* и по-рядко *L. tropica*, *L. major* и *L. (V.) braziliensis* (OIE, 2004).

Съществуват и отделни щамове при *L. infantum*, като най-често установявания в Европа е MON-1 (Kontos, 2004).

Срещат се в 2 форми на лайшманиите - амастиготна /безкамшична, с размери 2.5-6.5 x 1.5-3.5 μm /, паразитираща вътреклетъчно в макрофагите на гостоприемника и промастиготна /камшична-15-20 x 1.5-3.5 μm /, която живее в тялото на кръвосмучещите артроподи от род *Phlebotomus* (за Стария свят) и род *Lutzomya* (за Новия свят); кръвосмучещите артроподи наброяват около 700 вида. Флеботомусите се означават още и като "пясъчни мухи" в английската литература и като папатаци в българския вариант.

В **България** чрез qPCR и изолиране (среди RPMI 1640; Schneider's insects) е определен местния причинител на висцералната лайшманиоза по кучетата - *Leishmania infantum* (Цачев Ил., 2009). При хора също е изолиран местен щам на причинителя (среда NNN) (Харизанов, 2012).

Епизоотология. Лайшманиозата е трансмисивно заболяване с характерно ендемично разпространение. При хората кожната и висцералната форма са регистрирани в 88 държави (Dujardin et al., 2008) – 72 са развиващи се, а 13 от тях са сред най-бедните в света. При кучетата *L.infantum* е сериозен проблем в страните от Средиземноморския басейн и Средния Изток (Abranches et al., 1991; Ozbel et al., 1995; Nuwayri-Salti et al., 1997; Ozensoy et al., 1998; Vaneth et al., 1998). По-детайлни резултати от проведени изследвания показват следната серопревалентна картина:

- Португалия - 8,5% (Alvar, 2001)
- Македония – 9 % (Stefanovski et al., 2008)
- Кипър - 1,7-10,0% (Deplazes et al., 1998)
- Албания - 12,9% и един случай с изолиране на *L.infantum* (Kero and Xinxo, 1998; Sotira, 2000)
- Израел – 3,6 - 15% (Strauss-Ayali et al., 2001)
- Португалия – 18.7 (Cardoso et al., 2004)
- Иран - 2.6 - 21,6% (Faghih et al., 2002; Avizeh et al., 2006)
- Венецуела – 25% (Zerpa et al., 2003)
- Италия - 22.1 - 30.3% (Zaffaroni et al., 1999)
- Испания - 3-35% (Sarasa et al., 2000)
- Гърция - 3,7- 38,8 (Garifallou et al., 1989; Sideris et al., 1999; Boutsini and Patakakis, 2001)
- Франция - 10-40 % (Carlotti, 2003)
- Бразилия - 40.3 % (Torres et al., 2006)
- Хърватия - 42.85 (Zivicnjak et al, 2005)
- Босна и Херцеговина - 45% (Jazic et al., 1998)
- Малта - 28,9-52% (Fioretti et al., 1994)
- Турция - 65-76% (Ozbel et al., 2000).

Лайшманиозата се среща и в неендемични райони (внос на заразени кучета от чужбина) - Австрия, Белгия, Германия, Швейцария, Холандия, Англия, Френска Гвиана, Канада и САЩ (Diaz-Espineira and Slappendel, 1997; Slappendel and Ferrer, 1998; Swenson et al, 1998; Rotureau et al., 2006).

В **България** за първи път Дреновски провежда проучвания за лайшманиоза при кучета през 1941 година. От изследвани 100 кучета от град Петрич, серопозитивни за лайшманиоза са били 81%. По-късно Павлов отново при серологични изследвания установява в същия район 13.80% серопревалентност сред 160 кучета. *Клинична картина на заболяването не е била наблюдавана* (по Матов, 1958). По нататъшни проучвания върху лайшманиозата у нас прави колектива на д-р Г. Филипов от НЦЗПБ,

София. Изследвани са кръвни серуми от кучета от райони в Южна България /Раднево, Петрич, Асеновград/ с установена висцерална лайшманиоза при хора. Отрицателни са били резултатите при всички 122 проби от кучета (Filipov et al., 1997). Проучвания за лайшманиоза при кучетата са правени от Костова и сътр. (1998). Те изследват 50 кръвни серуми (от скитащи, домашни и полицейски кучета) от районите на Бургас, Кърджали и София. Работено е с ELISA и IFA и са открити следните титри: 1:40 - при 2 кучета, 1:80 - при 2 и 1:320 при 1 куче. Не са установили зависимост между случаите при хората и кучетата.

Източници на *L.infantum* са инвазираните животни и хора. От тях флеботомусните вектори смучат кръв и поемат амастиготните форми. Последните започват бързо да се размножават в чревния им канал, преминават в промастиготни форми и след 8-я-10-я ден, те стават инвазиоспособни. Хематофаги са само женските флеботомуси.

Гостоприемниците на лайшманиозата - куче, човек и др. се инвазират при ухапването от заразените флеботомуси, при което промастиготите попадат в неутрофилите и макрофагите. Те преминават в амастиготна форма и за 12-24 часа могат да достигнат до 200 броя в клетка. Лайшманиии се откриват в черния дроб, далака, костния мозък, лимфните възли, кожата, моноцитите на кръвта и др.

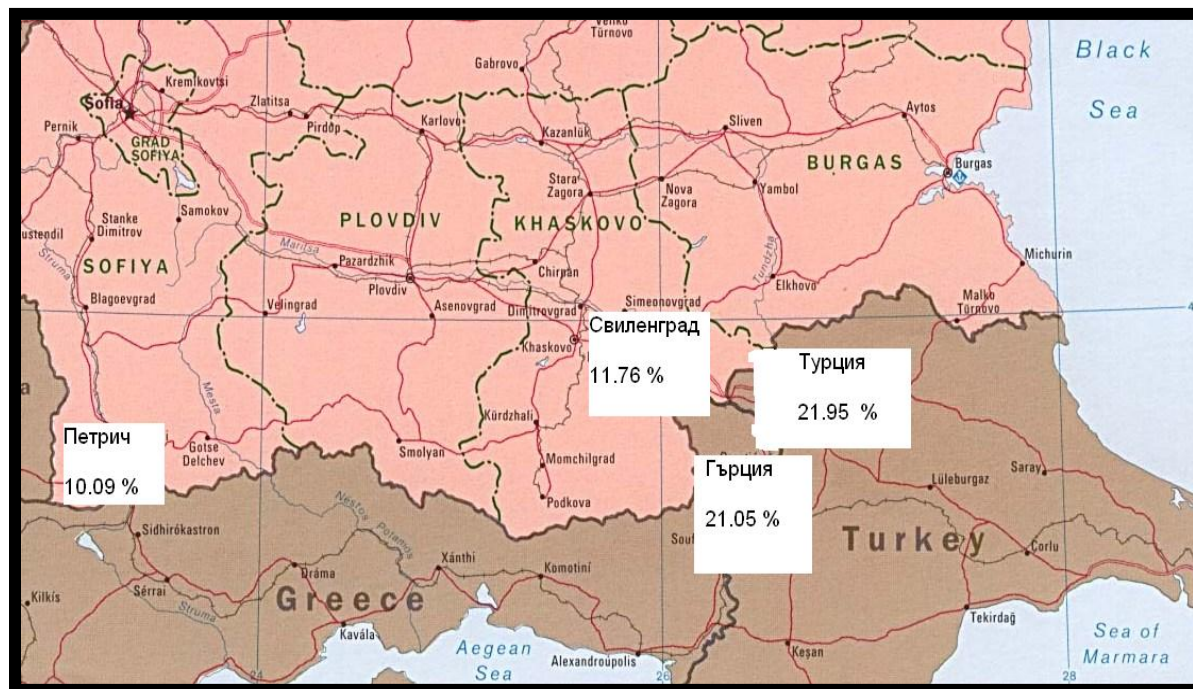
С лайшманиоза освен човека и кучето може да се заразят и лисицата, вълка, дивите гризачи, котката, камилата и коня (Василев и Вишняков, 1977, Генов, 1989; Петров 1992). От съществено значение за инфектирането е генетичната предиспозиция на гостоприемника, за което показват опитите с кучета и лабораторни животни (Altet, 2002).

Преносителите на *L.infantum* са флеботомуси (папатаци). Наброяват около 600 вида, от които над 70 вида са доказани или предполагаеми преносители на лайшманиозата (Христова и сътр., 2001). Флеботомусите са с размери от 1 до 5 mm. Летят на подскоци и обикновено смучат кръв от кожата около очите, под веждите и около носа. Кръвосмученето се реализира най-често когато кучето е неподвижно или спи.

Флеботомусите се размножават интензивно през месеците от май до ноември, а проявяват своята активност най-подчертано вечер - от 21 h до 5 h, а в тъмни помещения - пещери, мазета и др. - по-всяко време. През деня те се крият на тъмно, включително по храсти и дърветата. Живеят от 14 до 45 дни, като поемат кръв още през първите 24-48 h от живота си, а след това на всеки 3-5 дни. Женската снася между 40-70 яйца в тъмни места, които преминават през стадии на ларва, нимфа и имаго за 28-82 дни. В Средиземноморския басейн са открити 19 вида флеботомуси. В Италия най-често срещаните са: *Phlebotomus neglectus*, *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus mascittii*, *Sergentomya minuta* (Ferroglio et al., 2005). В Гърция са установени 12 вида (*Phlebotomus neglectus*, *P.perfiliewi*, *P.tobbi*, *P.balcanicus*, *P.simici*, *P.papatasi*, *P.serengeti*, *P.similis*, *P.alexandri*, *P.mascitii*, *Sergentomyia dentata* и *S.minuta* (Haralambidis, 2001).

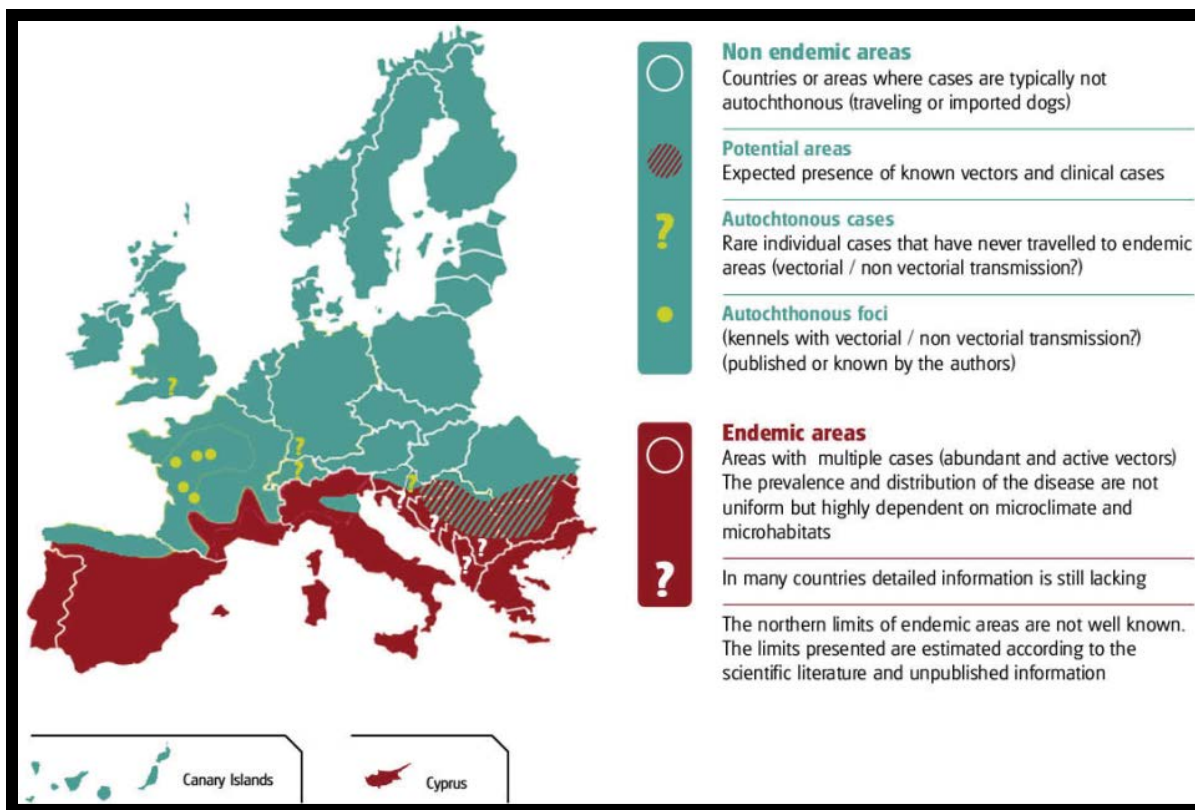
У нас флеботомусите, с потенциал за вектори на заболяването, са 5 вида: *Phlebotomus balcanicus*, *Ph. perniciosus*, *Ph. sergenti*, *Ph. papatasi* и *Ph. tobbi* (Mikov and Harizanov, 2012).

Проведени през 2007 г. изследвания сред 312 кучета илюстрират серопревалентността в граничните райони на България, Турция и Гърция - Фиг.1.



Фиг. 1. Серопревалентност при кучета-2007г

От 2007 г. България попада в категорията ендемична страна за лайшманиоза при кучета (Фиг. 2).



Фиг.2 Ендемични и неендемични страни в Европа за лайшманиоза при кучета
(Solano-Galego et al., 2011)

Досегашни проучвания показват болни от *автохтонна лайшманиоза* кучета в: Петрич, Благоевград, София, Пловдив, Златоград, Казънлък, Първомай, Свиленград, Харманли, Разград. *Вносна лайшманиоза* е регистрирана в Габрово, Силистра, Бургас, Стара Загора (Цачев, 2014). Проучвания сред съмнителни за лайшманиоза кучета от района на град Петрич през 2013-2014 г. показват 50% морбидитет (Цачев, 2015)

Клинична картина. Инкубационният период на лайшманиозата може да е от три месеца до няколко години. Документиран е случай със седем годишен инкубационен период (Anon.2004).

Изявите на клиничната картина на заболяването, настъпили от 3 месеца до 7 години от инфектирането, са представени в Табл. 1.

Основни клинични признаци

Признаци	Честота на срещане (%)
Кожни промени	81 - 89 ^{a,b}
Лимфаденомегалия	65.2 - 90 ^{a,b,c}
Бледи лигавици	58 ^a
Очни промени	18 ^c
Кахексия	10.1 - 47.5 ^{a,b,c}
Спленомегалия	9.5 - 53.3 ^{a,b,c}
Треска	4 - 36 ^{b,c}
Епистаксис	6.3 - 10 ^{a,c}
Артропатии	3.2 - 4 ^{a,c}
Асцит	1.3 - 3 ^{a,c}
Кожни промени	
Клинична изява	Честота на срещане (%)
Ексфолиативен дерматит	56 - 64.1 ^{a,c}
Улцерации	34.4 - 40 ^{a,c}
Онихогрипоза	20 - 30.5 ^{a,b,c}
Назална хиперкератоза	18.8 ^a
Дигитална хиперкератоза	14.1 ^a

Възли	2.1-6 ^{a,b}
Очни промени	
Клинична изява	Честота на срещане (%)
Конюнктивит	24 - 32.5 ^{a,b}
Блефарит	12 ^a
Кератит	7.5 ^b
Keratoconjunctivitis sicca	5.1 ^a
Увеит	1.3 - 8.2 ^{a,b}

Табл.1. Клинични промени при лайшманиоза при кучето
^a(Koutinas et.al.,1996); ^b(Slappendel, 1998); ^c(Ciaramella et al., 1997)

От лайшманиоза боледуват кучета от различни възрасти, породи, както мъжки така и женски (Slappendel and Ferrer, 1998), като при по-младите преобладава асимптомната изява.

В някои ретроспективни изследвания се отбелязва, че средно между 9 месеца и 15 години са най-често засегнатите възрастови групи (средна възраст 5 години) (Koutinas et al., 1999).

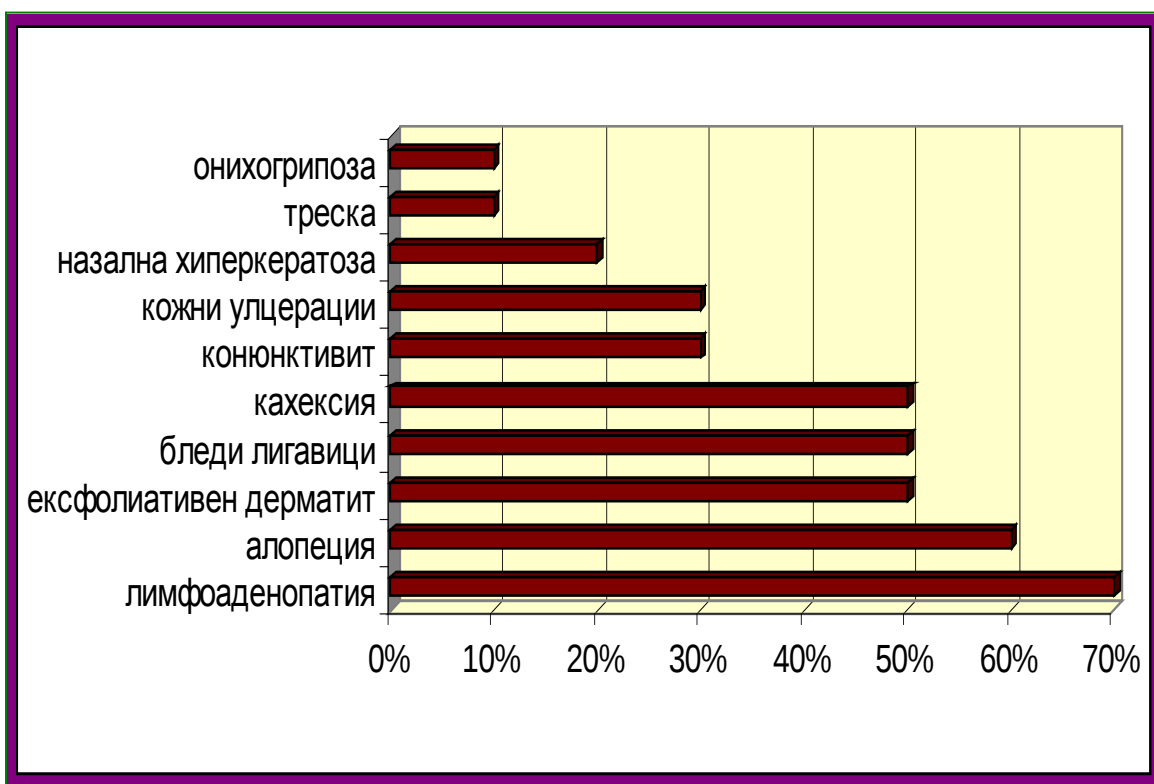
Стопаните на болните животни забелязват най-често кожните промени (50%), прогресивното слабееие (25.3%), загубата на апетит (16.5%) и умората (10%). Други клинични признаци съпътстващи заболяването са депресията, промените в очите, повръщането, мелената, кихането, епистаксиса, кашлянето и куцотата (Pugliese et al., 1990; Pugliese et al., 1992; Pugliese et al., 1996; Ciaramella et al., 1997; Slappendel, 1998; Koutinas et al., 1999; Pugliese et al., 2006; Petanides, 2008; Mylonakis et al., 2008). Има описани случаи и на перитонит (Adama-Moraito et al., 2004) и асимптоматичен колит (Adama-Moraito et al., 2007).

Лайшманиозата протича и субклинично, особено в ендемичните райони (Gallego, 2008), където може да надхвърли 75% (Orndorff et al., 2000). В епидемиологично проучване проведено в Турция установяват само при 19% от серопозитивните кучета клиника на

заболяване (Ozbel et al., 2000). В по-нови проучвания проведени пак Турция (Анкара) (Aslantas et al., 2005), също подкрепят тезата за особеното значение на серопозитивните кучета с латентна форма.

През 1986-1994 година изследвания сред 1638 безсимптомни кучета в района на Атина, Гърция показват при 366 (22.4%) антитела на *Leishmania infantum* с титър 1/200 и при 53 (3.2%) с титър 1/100. От тях при 212 титърът е бил 1/1600, при 57 - 1/800, при 38 - 1/400 и при 59 титър 1/200 (Sideris et al., 1999).

Клиничната симптоматика (%) при кучета с лайшманиоза от **България** е дадена на Фиг.3-Фиг.7 (Цачев,2009).



Фиг.3 Клинични признаци (%) при кучета болни от лайшманиоза в България



Фиг 4. Периорбитална алопеция, блефарит,
назална и аурикуларна хиперкератоза



Фиг 5. Кожни улцерации



Фиг 6. Конъюнктивит и кератит



Фиг 7. Ексфолиативен дерматит

Проучвания от **България** показват, че в район с ендемично проявление на лайшманиозата (Петрич), кучетата засегнати от латентна форма на инфекцията са между 6-18% (Цачев,2014).



Фиг 8. Куче с латентна лайшманиоза

Параклиника. Типичните хематологични и биохимични отклонения в кръвта и промените в урината са отразени в Табл.2.

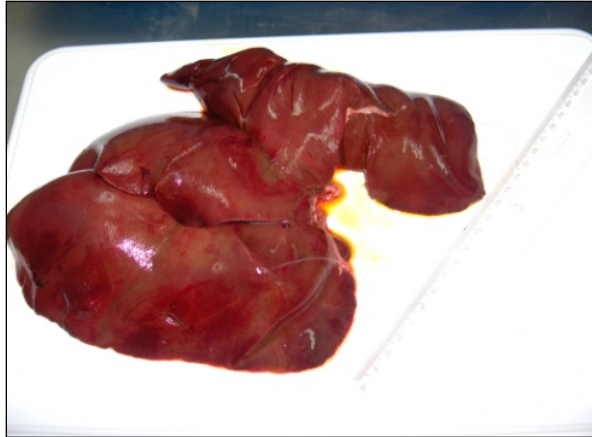
Промени в кръв и урина	
Лабораторен параметър	Честота на срещане (%)
Хиперпротеинемия	63.3 - 72.8 ^{a,c}
Хиперглобулинемия	70.6 - 100 ^{b,c}
Хипоалбуминемия	68 - 94 ^{b,c}
Намалено съотношение албумин/глобулин	76 ^c
Нерегративна анемия	60 - 73.4 ^{a,c}

Тромбоцитопения	29.3 - 50 ^{b,c}
Левкоцитоза	24 ^c
Левкопения	22 ^b
Повишени чернодробни ензими	16 ^c
Покачване на урея и креатинин	16 - 45 ^{b,c}
Средна/висока протеинурия	71.5 - 85 ^{a,b}
Хиалинови гранули в урината	До 100 ^a

Табл.2. Параклинични промени при лайшманиоза при кучето
^a(Koutinas et.al.,1996); ^b(Slappendel, 1998); ^c(Ciaramella et al., 1997)

Патоморфология. Патоанатомия. Повечето от лайшманиозните кучета, особено при тези с хроничен ход на заболяването, са силно кахектични. Най-тежки поражения *post mortem* се откриват по кожата и богатите на ретикулоендотелна тъкан органи. Всички лимфните възли са увеличени, както и далака (Димов и Колев, 1980). Хепатомегалия се установява само понякога. Малки фокални грануломи могат да се установят в различни органи, включително кожата и бъбреците. По мукозата на стомаха, тънките и дебелите черва са наблюдавани улцерации. Петехии и екхимози по мукозата и серозата са рядкост (Baneth G., 2006). Остеолитични и пролиферативни периостални лезии са откривани в различни части от скелета (Agut et al., 2003). **Патохистология.** Хистологично при лайшманиозата са налице грануломатозни пролиферации и периваскуларен дерматит. Мултифокални или дифузни плазматични огнища се наблюдават в кожата далака, лимфните възли, черния дроб, бъбреците, костния мозък, тънките черва, конюнктивата с голям брой амастиготни форми в макрофагите. Амастиготни лайшманийни форми са описани и в алвеоларните макрофаги (Longstaffe et al., 1983; Swenson et al.,1988), чревната lamina propria (Mugai et al.,1983, Keenan et al.,1984), пикочния мехур (Gomez-Nieto, 1990) и тонзилите при експериментална инфекция (Keenan et al., 1984). В бъбреците е налице гломерулонефрит с интерстициален нефрит и амилоидоза (Nieto et al., 1992). Амилоидоза може да се констатира и в черния дроб и други вътрешни органи. Нервната система също може да бъде засегната - в хориодния плексус се доказват амастиготи (Nieto et al., 1996).

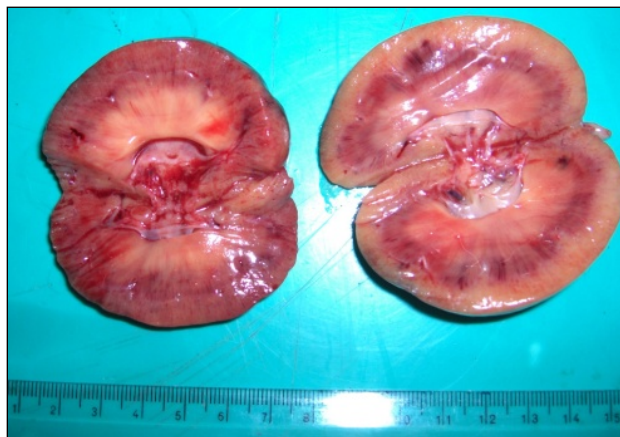
Оригинални патологоанатомични и патохистологични фотоси на кучета от България са представени Фиг.9-Фиг.17 (Цачев, 2009).



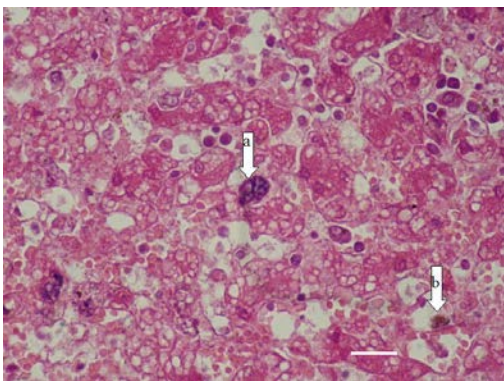
Фиг.9. Хепатомегалия



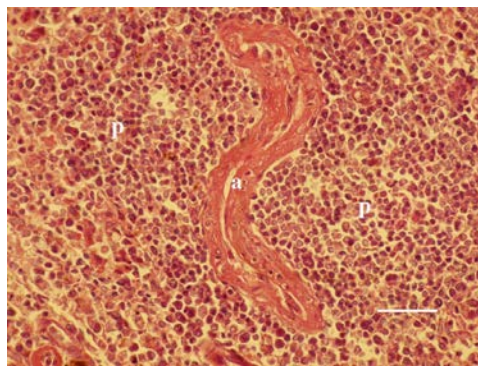
Фиг 10. Спленомегалия и лимфаденит



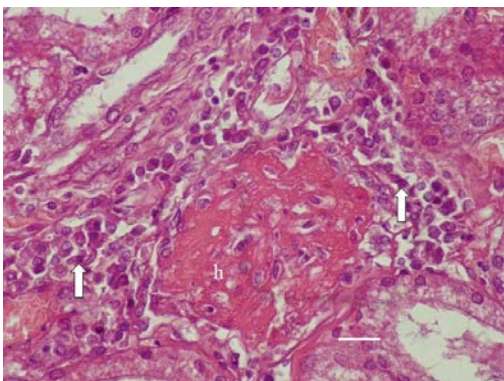
Фиг.11. Интерстициален нефрит



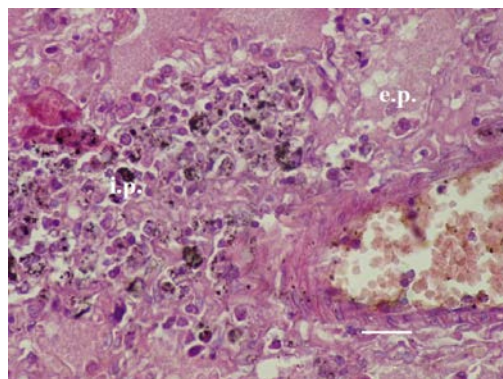
Фиг.12. Черен дроб. Активирани купферови клетки; с амастиготи (стрелка - а), хемосидерин (стрелка – b), Н/Е, bar = 3 μ m



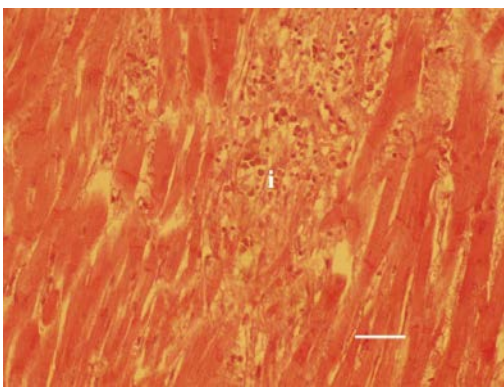
Фиг.13. Далак. Периартериоларна (а) пролиферация на лимфобласти, лимфоцити и плазматични клетки (p), Н/Е, bar = 3 μ m]



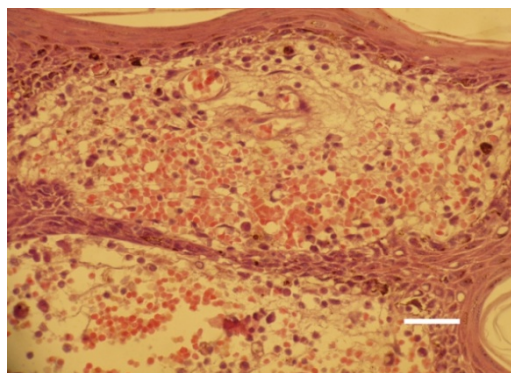
Фиг.14. Бъбрек. Интерстициални мононуклеарни пролиферати (стрелките) и тотална хиалиноза на гломерула, Н/Е, bar = 4 μ m



Фиг.15. Бял дроб. Лезии характерни и за интерстициална (i.p.) и за ексудативна пневмония (e.p.), Н/Е, bar = 3 μ m



Фиг.16. Сърце. Миокардиален инфаркт, организация, Н/Е, bar = 4 μ m



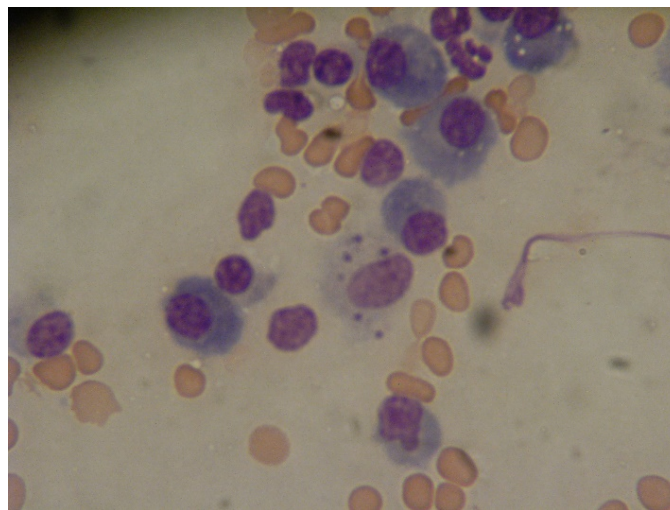
Фиг.17. Ухо-кожна проба. Везикулозен тип епидермална лезия, хеморагично филтрирана, Н/Е, bar = 3 μ m

Диагностика. Имунодиагностика. Заразяването на гостоприемника е свързано с поява на анти-лайшманийни антитела. Разработени са различни специфични серологични методики: индиректна имунофлуоресценция /IFA/, директна аглутинация (DAT), ELISA, competitive-ELISA, dot-ELISA, slide-ELISA и western blotting (Rachamim et al., 1991; Mancianti et al., 1996; Ciaramella et al., 1997; Vercammen et al., 1997; Slappendel and Ferrer, 1998; Slappendel, 1998; Koutinas et al., 1999).



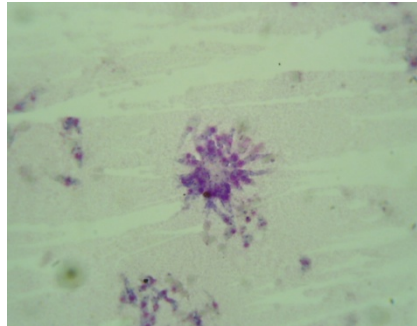
Фиг.18. Позитивен Snap Elisa тест (Цачев, 2009)

Цитология и хистология. Амастиготните форми на *Leishmania* добре се демонстрират на разтилка/отпечатъчен препарат от лимфен аспират, далак и костен мозък, оцветени по Гимза или с Diff-Quick. Те се откриват в макрофагите и извън тях (Димов и Камбуров, 1986), с кръгла до овална форма, съдържащи базофилни ядра. Материал за изследване може да се вземе и от кожни лезии след скарификация или аспириране с игла и спринцовка.



Фиг.19. Амастиготни форми в моноцит - отпечатъчен препарат от ухо (Цачев, 2015)

In vitro култивиране. За култивиране се използват най-често средите Novy-MacNeal-Nicolle (NMN), brain-heart infusion (BHI) medium, RPMI 1640, Evan's modified Tobie's medium (EMTM) и Schneider's *Drosophila*. Подходящ материал за *in vitro* култивиране е аспират от лимфен възел, далак или костен мозък.

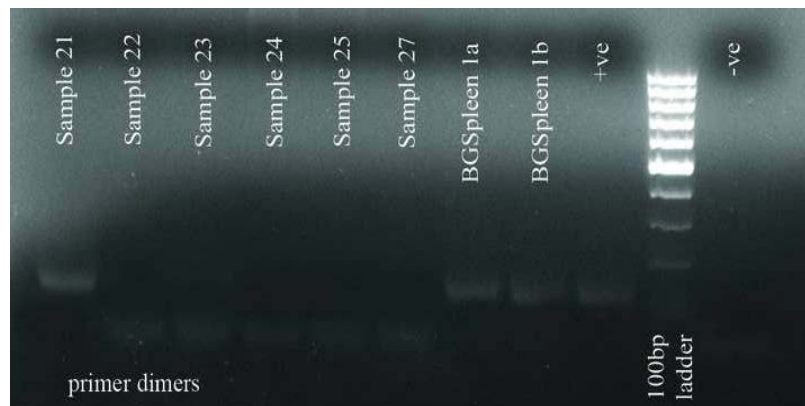


Фиг.20. Промастиготи на *L.infantum* (Цачев, 2009)

In vivo култивиране. До него рядко се прибегва – само за научни цели. Използват се хамстери и се следи клиничната изява на лайшманиозата.

Имунохистохимия. Прилага се на хистопрепарати от кожа и лимфни възли чрез индиректна пероксидазна техника. (Bourdoise et al., 1997).

Полимеразно-верижна реакция (PCR). През последните десетина години PCR техниката навлезе и в диагностиката на лайшманиозата при кучетата (Ashford et al., 1995; Mathis & Deplazes, 1995; Berrahal et al., 1996; Reale et al., 1999; Roura et al., 1999; Campino et al., 2000; Quinnell et al., 2001; Fisa et al., 2001; Martin-Sanchez et al., 2001; Solano-Gallego et al., 2001, Pantchev N. et al, 2015). Тя се оказва много удобна реакция за доказване на генни секвени rRNA /RT-PCR/ (Mathis and Deplazes, 1995) в лимфни възли и кръв. Възможно е с нея да се търси и кинетопластна ДНК на *Leishmania* spp. (kDNA) при кожни биопсии /100% чувствителност и 100% специфичност/ (Reale. et al., 1999; Roura et al., 1999). Все още се разработва тази техника с цел повишаване на нейната чувствителност при различни материали за изследване.



Фиг.21. qPCR- положителен за *Leishmania infantum* (Цачев, 2009)

Идентификация на *Leishmania* spp. Изключително важно е тя да бъде направена, за да може да бъде харатеризирана правилно епидемиологичната картина и особено трансмисията на причинителите. Изоензимния анализ се явява "златен стандарт" но той е изисква висока концентрация на промастиготни форми (5×10^9 – 1×10^{10}) и много време, защото всеки изолат трябва да бъде изследван с няколко ензимни реакции (Le Blancq et al., 1987). PCR успешно използва kDNA праймери, специфични и за Европа и за Америка (Ashford et al., 1995; Belli et al., 1998).

Терапия. Най-често използваните етиотропни лекарствени средства включват:

- **Антимонови препарати.** Най-широко използвани са петвалентните препарати (Glucantime, Pentostam) (Фиг. 22). Те инхибират гликолитичните ензими на лайшманиите. Стандартния курс включва 75-100 mg/kg/дневно - подкожно или венозно за 3- 4 седмици (Slappendel and Ferrer, 1998). След първите инжекции понякога се получава болка при инжектирането на останалите. Терапията е скъпа, особено за едрите кучета и може да се наблюдава и лекарствена резистентност (Gramiccia et al., 1992).

- **Allopurinol.** Allopurinol (Milurit) (Фиг. 21) е аналог на hypoxanthine. Механизмът на действие включва инкорпориране в РНК и повлияване на протеинния синтез. Обикновено allopurinol се изписва по 20 mg/kg/на ден per os. Цената на препарата не е висока и той е с относително ниска токсичност. Прилага продължително време и най-често в комбинация с антимонови препарати - 10 - 15 mg/kg/ на ден Р.О. за 2 - 24 месеца. Добре отчетлив е неговия клиничен ефект, няма странични действия но е възможен релапс (Ginel et al., 1998; Cavaliero et al., 1999) .

- **Pentamidine.** Доза: 4 mg/kg/ мускулно на 48 часа. Инжектирането е болезнено, а курса на лечение е 15 инжекции минимум (Lindsay et al., 2002).

- **Amphotericine B.** Amphotericine B е антибиотик и е първия противогъбичен препарат. Той уврежда клетъчния пермабелитет на лайшманиите. Има токсично действие върху бъбреците. Липозомалния му вариант (AmBisome) е с редуцирани страничните ефекти, но терапията с този препарат е скъпа (Banet, 2001).

- **Paromomycin Aminosidine.** Той е рибозомален инхибитор. Прилага се 30 дни в доза 10 mg/kg/ двукратно дневно - IM или SC. Продукта е с нефро- и ото-токсично въздействие.

- **Miltefosine.** Miltefosine (Milteforan) (Фиг. 21) е фосфолипиден препарат, ефективен при терапията на хора, мишки и кучета (Miro, 2008). Проучвания правени наскоро в Испания, Франция, Италия показват, че приема от 2 mg/kg вътрешно, един път на ден за 28 дни, е много добър избор за терапия на лайшманиозата при кучета.



Фиг. 22. Препарати за лечение на лайшманиоза

Освен специфичните лекарствени препарати може да се използват и:

- **Гликокортикоиди** /преднизолон 1-2 mg/kg/ - показани са при субакутна бъбречна недостатъчност, заедно с allopurinol (Carlotti, 2003). При тяхното прилагане трябва да се отчитат и техните странични действия.

И след приложеното лечение, съпроводено с клинично оздравяване и спадане на титъра на антителата, често пълно елиминиране от организма на лайшманиите не се постига (Roze, 2003).

Профилактика и контрол

Санитарна профилактика – евтаназия на заразените кучета е мярка която се прилага в редица страни. В Гърция със закон тя е регулирана. От етична гледна точка обаче тя е неприемлива, защото съществуват достатъчно на брой и ефективни етиотропни средства за терапия. В Бразилия за лайшманиоза се изследват годишно 850 000 кучета и от тях 20 000 се регистрират като серопозитивни (Reithinger and Davies, 2002).

Медицинска профилактика – тя е по-скоро емпирична мярка. Етиотропно третиране на всеки 5-6 месеца може да предотврати релапс, но все пак не е препоръчителна /токсичен ефект, възможност за изграждане на резистентност/. Профилактиката с “научен подход” изисква рутинни серологични проверки на имунитета – най-малко един път годишно.

Ваксинации – голям брой антигени са използвани за направата на ваксини – убити лайшмании, атенуирани лайшмании, рекомбинантни и синтетични протеини, непротеинови антигени, имуногени експресирани в бактерии и вируси, повечето от които на модел мишки и ограничен брой на хора (Handman, 2001). На пазара има търговски ваксини вече - за съжаление няма надеждни резултати от тяхното приложение (Rhalem and Sahibi, 1999; Ramos et al., 2002; Eisenberger and Jaffe, 2004).

Инсектицидни препарати – те се препоръчват за да се предпазят кучетата от ухапвания от флехотомуси (Otranto and Wall, 2008). Един от най-популярните препарати за профилактика на лайшманиозата е Scalibor (Intervet). Той съдържа делтаметрин със 90% протективност срещу флехотомосите и с продължителност 7 1/2 месеца (Killick-Kendrick et al., 1997; Killick-Kendrick, 2001). Направени проучвания в Бразилия потвърждават отличния

профилактичен резултат след неговото приложение в приют за кучета от ендемичен за лайшманиоза район за период от 24 месеца (Ribeiro et al., 2005).

Добра профилактична мярка е прибиране на кучето в закрито помещение 1 час преди изгрев слънце и 1 час преди залез - периода когато флебутомосите не са активни (Banet , 2001; Strauss-Ayali and Baneth, 2001).

Лайшманиоза при хората. Висцералната лайшманиоза при **хората** протича хронично с фебрилитет, сплено-хепатомегалия, анемия, левкопения, тромбоцитопения, кахексия и вторична имуносупресия. Известна е още като детска висцерална лайшманиоза, кала-азар, “черна болест”, тропическа фебрилна спленомегалия, треска “Dum - dum”, кахектична треска, инфантилна спленична анемия, немаларична ремитентна треска, болест на Сахиб, “Асамска треска” и др. Висцералната лайшманиоза е индикаторна паразитоза при HIV – инфекция. В Европа и в частност на Балканите тя се причинява от *Leishmania infantum*. По данни на СЗО повече от 350 милиона души в 88 страни живеят с риска от заразяване, а над 12 милиона са вече заразени (WHO/LEISH, 1996; Zimmerman et al., 2008). Ежегодно се регистрират между 100 и 150 хил. нови случаи, като много остават и недиагностицирани .

Статистиката показва, че най-често заболяването се среща сред децата и сред HIV позитивните, а при болните от AIDS - лайшманиозата е особено опасна вторична инфекция (De Gorgolas and Miles, 1994). Сериозен проблем е разпространението на лайшманиозата и чрез интравенозни апликации на различни средства, включително и наркотици (Alvar, 1996).

За съседните на България страни - Гърция и Турция - констатираните случаи на лайшманиоза при хората 1998-2004 г. са отразени в Таблица 3 (^b OIE, 2008).

Година	Гърция Брой случаи	Турция Брой случаи
2004	3	4217
2003	16	2521
2002	52	2766
2001	46	1011

2000	41	няма данни
1999	27	1010
1998	25	1421

Табл.3. Гърция и Турция - констатирани случаи на лайшманиоза при хората за периода 1998-2004 година.

В **България** пръв внесен случай на висцерална лайшманиоза е наблюдаван през 1921 г. от Моллов (Моллов, 1931). През 1939 г. също Моллов диагностицира и първия автохтонен случай на висцералната лайшманиоза. (Груев, 1949).

Братанов (1952) публикува клинични наблюдения при 31 деца и 3-ма възрастни. За периода 1937-1953 години са регистрирани общо 57 случая на висцерална лайшманиоза, при които заразяването е станало в страната, а 50 от засегнатите са в детска възраст (Груев, 1949; Братанов, 1952; Андреев и сътр., 1958; Генов, 1989). Следва 30 годишен период на епидемиологична ремисия, в който се регистрират само внесени случаи на висцерална лайшманиоза.

Проучвания върху лайшманиозата у нас в последно време показаха тревожно нарастване на случаите - от 1988 до 2002 са регистрирани 67 клинично болни, между които и 4 месечно бебе (Филипов и сътр., 2003). За същия период починалите са 14 или 20.8% - 12 деца и 2-ма възрастни.

През 2004 година е регистриран рецидив на заболяването при пациент с HIV-инфекция.

Поради закъсняла диагноза и лечение 3 от случаите през 2005 година завършват летално (Курдова и сътр., 2006).

Добре подчертано е географското разпространение на заболяването - предимно в Южна България са случаите (Petkov et al., 1998, Чакърова и кол.,2004), като в Старозагорски регион заболяемостта е 50.7%, следвана от Благоевградски (16.4%) и Пловдивски (16.4%) (Филипов и сътр., 2004).

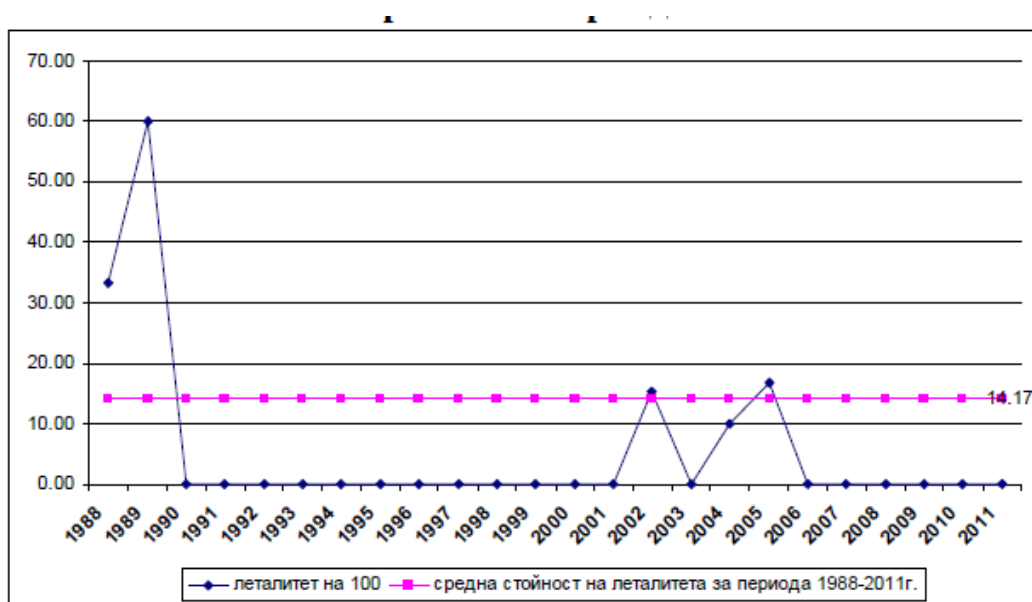
Проучванията за област Пловдив на Вучев и кол., 2007 показват, че за периода 1993-2003 пациентите с висцерална лайшманиоза са 10. Всички те са автохтонни като 5 от тях са до 18 годишна възраст, а останалите 5 – до 64 годишна възраст. При два от пациентите изхода е бил летален.

Най-много регистрирани случаи на лайшманиоза в България има от района на град Петрич - 6 за периода от 1988 до 2002 и 6 от 2004 и 2005 година (Филипов и сътр., 2004; Курдова и сътр., 2006; Курдова и сътр., 2007).

За 2006 година висцерална лайшманиоза е констатирана при 5 пациента (Курдова и кол., 2007) – 3 деца и 2-ма възрастни. Заболелите отново са от ендемичния район на град Петрич (4) и от град Свиленград (1).

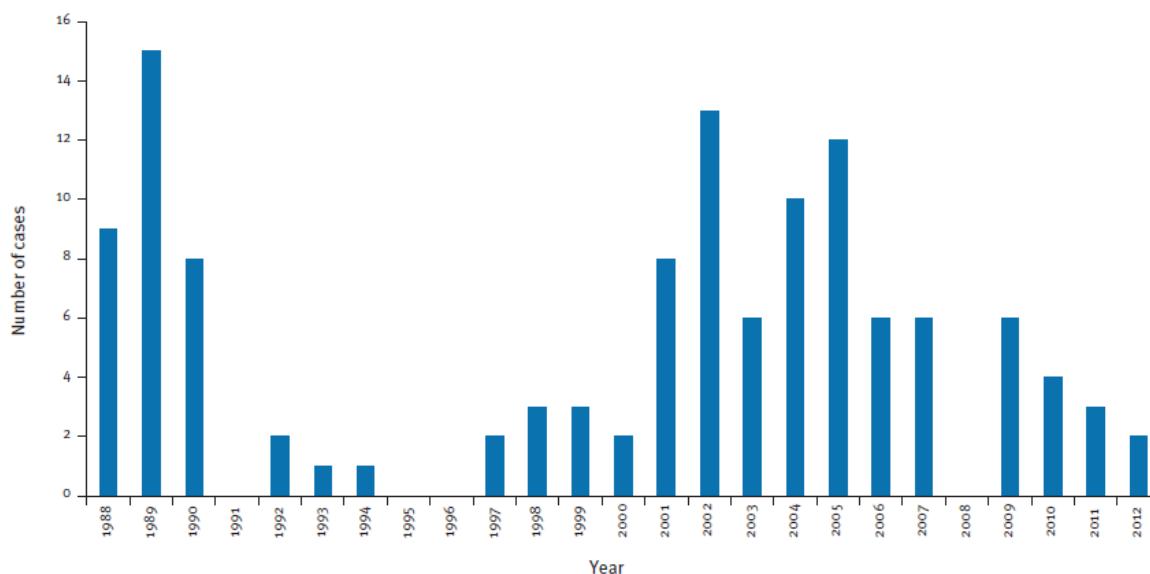
Много подробни описания върху лайшманиоза у нас прави Вутова (2007), която описва 20 клинични случаи на висцерална лайшманиоза за 30 годишен период на проучване – 1976 - 2005. Подчертано е многообразието в клиничната картина на заболяването и промените в хематологията му - продължителен фебрилитет, хепатомегалия, спленомегалия, анемия, левкопения и тромбоцитопения. Описани са и проведените терапии и изходите от клиничното състояние.

Обстойни проучвания върху лайшманиозата при хората в България (1988-2011) са направени от Харизанов (Харизанов, 2012). Той констатира висцерална лайшманиоза в 13 области на Южна и Северна България - показател за повсеместно разпространение на заболяването и фактическа природна огнищност за голяма част от територията на страната. Твърде висок е и отбелязания летаталитет у нас за периода 1988-2011 – 14.7%. Най-висок е той през 1989г. – 60.00% и 1988г. – 33.33%.



Фиг.23. Динамика на леталитета при лайшманиоза в България – 1998-2011 (Харизанов, 2012)

Последни публикувани данни на Харизанов илюстрират регистрираните случаи у нас от 1998 г. до 2012 г. – Фиг. 24 (Harizanov et al, 2013).



Фиг. 24. Регистрирани случаи на лайшманиоза в България 1988-2012 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев И., Ангелов А., Карапанчев Б. Наблюдения на случай от кала-азар в детска възраст. Въпроси пед., акуш., гинек., 2: 38-46, 1958.
2. Братанов Б. Първи приноси към автохтонната детска висцерална лайшманиоза в България. Научни трудове-вътрешни и детски болести. ИСУЛ: 113-158, 1952.
3. Василев В., Вишняков Ю. Ветеринарна паразитология и инвазионни болести. Земиздат: 253-255, 1977
4. Вучев Д., Русинова А., Енева К., Благоева В., Масарлиева А. Висцералната лайшманиоза в Пловдивска област. Научни трудове на СУБ –клон Плавдив. Серия медицина, фармация и стоматология, т.VII. Научна сесия "Медицина и стоматология" 10-ти ноември 2006, Пловдив: 124-126, 2007.
5. Вутова К. Висцерална лайшманиоза - клинични, лабораторни особености и лечение. *Медицински преглед*, 43, 3, 26-31, 2007.
6. Генов Г. Практическа паразитология. Знание, 310 стр., 1989.
7. Груев Т. Принос към изучаването на лайшманиозата (кала-азар) у нас. *Медицински летописи*. 8: 845-855, 1949.
8. Димов И., Колев Г. Тропически болести по домашните животни. Земиздат: 106-108, 1980.

9. Курдова Р., Йорданова Д., Вучев Д., Райнова И., Филипов Г., Иванова М., Харизанов Р., Маринова И., Маринова Т. Състояние на паразитозите при хората в България през 2003-2005г. *Информационен журнал, НЦЗПБР*, 3, 4-24, 2006.
10. Курдова Р., Петров П., Йорданова Д., Райнова И., Иванова М., Харизанов Р., Маринова И. Паразитна заболяемост в България през 2006 г- състояние противоепидемичен контрол, прогноза. *Информационен журнал, НЦЗПБР*, 3, 4-30, 2007.
11. Матов К. Паразитология и арахноентомология. София., Земиздат, 96-97,1958.
12. Петров П. Паразитология, Медицина и физкултура, 176 стр., 1992.
13. Филипов Г., Димитров Х., Харизанов Р., Йорданова Д., Курдува Р., Вучев Д. Висцералната лайшманиоза в България- минало и настояще. 8 Национален конгрес по инфекциозни болести епидемиология и паразитология. Резюмета и доклади,16-17 май, Пловдив: 14-18, 2003.
14. Филипов Г., Харизанов Р., Йорданова Д., Вучев Д., Курдува Р., Димитров Х. Съвременно състояние на висцералната лайшманиоза в България. *Инфектология*, 4: 29-31, 2003
15. Филипов Г., Харизанов Р., Русинова А., Рашева Г., Канева Е., Чакърлова Б., Масръчка Е.. Географско разпространение на висцералната лайшманиоза в България. *МедФарм*, III-IV:7-8, 2004.
16. Харизанов Р. Природно-огнищни, епидемиологични, клинико-диагностични и терапевтични аспекти на висцералната лайшманиоза в България. Автореферат, София, 66 стр., 2012
17. Христова Т., Вучев Д., Вукова Т., Алфандари К. Флеботомусите като преносители на висцералната лайшманиоза. *ДДД Бюлетин*, НЦЗПБ, 3-4, 2001.
18. Цачев Ил. Екзотични зоонози по кучетата в България (моноцитна ерлихиоза, гранулоцитна анаплазмоза, висцерална лайшманиоза): откриване и проучване. Дисертация (доктор на ветеринарномедицинските науки). Тракийски университет, Стара Загора, 315 стр., 2009.
19. Чакърлова, Б., Пировски, Н., Филипова, В., Чакърлов, Св., Пекова, Л. Два случая с висцерална лайшманиоза в Старозагорски регион. *Сборник СУБ*, клон Стара Загора: 162-164, 2004.
20. Abranches P., Silva-Pereira D., Conceicao-Silva F., Santos-Gomes G., Janz J. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, 77: 57-561, 1991.
21. Adamama-Moraitou K. K. , Prassinou N. N. , Patsikas M. N. , Psychas V., Tsioli B., Rallis T. S. Sclerosing encapsulating peritonitis in a dog with leishmaniasis, *Journal of Small Animal Practice*, 45, 2:117 – 121, 2006.
22. Agut A, Murciano J, Laredo F, Soler M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Vet Rec*, 153: 648-652, 2003.
23. Altet L., Francino O., Solano-Gallego L., Renier C., Sanchez A. Mapping and sequencing of canine NRAMP1 gene and indentification of mutations in leishmaniosis-susceptible dogs. *Infection and Immunity*, 70:2763-2771, 2002.

24. Alvar J, Gutiérrez-Solar B., Pachón I., Calbacho E., Ramírez M., Vallés R., Guillén J., Cañavate C., Amela C. AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem. *Clin Dermatol*, 14:541-546, 1996.
25. Alvar J. Las Leishmaniasis: Dela Biologia al Contro Laboratorios, Intervet S.A.Salamanka, 2001.
26. Anon. Leishmaniasis (*cutaneous and visceral*) ,Center for Food Security and Public Health College of Veterinary Medicine Iowa State University, 2004
<http://www.cfsph.iastate.edu>
27. Antoniou M., Haralambus C., Mazeris A., Pratlong F., Jean-Pierre Deler, Soteriadou K. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. The Lancet, 8, January, 6-7, 2008.
28. Ashford D., Bozza M., Freire M., Miranda J., Sherlock I., Eulalio C., Lopes U., Fernandes O., Degrove W., Barker R., Badaro J., David J. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 53:251-255, 1995.
29. Aslantaş Ö., Özdemir V., Kiliç S., Babür C. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. *Veterinary Parasitology* 129, 3-4 : 187-191, 2005.
30. Avizeh R., Mohebbali M., Sheikholeslami M. Seroepidemiological investigations of visceral leishmaniasis in dogs of Ahvaz, Iran. PROCEEDINGS.WORLD CONGRESS WSAVA/FECAVA/CSAVA, Prague, 837-838, 2006.
31. Baneth G., Breitschwerdt E., Hegarty B., Pappalardo B., Ryan J. A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. *Vet. Parasitol.*, 74: 133–142, 1998.
32. Baneth G., Dank G., Keren-Kornblatt E., Sekeles E., Adini I., Eisenberger C., Schnur L., King R., Jaffe C. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. *Am J Trop Med Hyg*, 59:722-725, 1998.
33. Baneth G. Canine hepatozoonosis. In: Encyclopedia of Arthropod-transmitted Infections of Man and Domesticated Animals. Ed M. W. Service. CABI Publishing, Wallingford. Pp. 215-220, 2001.
34. Baneth G. Chemotherapy of canine leishmaniasis. Abstract book, Worldleish 2, Crete, Greece – 20 to 24 May; 39, 2001.
35. Baneth G. Leishmaniasis. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3rd Ed. C. Greene. W. B. Saunders, Philadelphia, pp 685-698, 2006.
36. Belli A., Rodriguez B., Aviles H., Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 58:102-109, 1998.
37. Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., Dunan, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 55:273-277, 1996.
38. Bourdoiseau G., Marchal T., Magnol J. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest*, 9:439-440, 1997.

39. Boutsini S., Patakakis M. Dog leishmaniasis in Attiko between 1995-2000. 6-th Hellenic Symposium of Small Animal Practitioners, March 2001, pp.117, 2001.
40. Campino, L., Santos-Gomes, G., Riza Capela, M.J., Cortes, Abranches, P. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 92:269-275, 2000.
41. Cardoso L., Rodrigues M., Santos H., Schoone G. J., Carreta P., Varejão E., Benthem, B. van, Afonso, M. O. Alves-Pires, C., Semião-Santos S. J., Rodrigues, J., Schallig H. D. F. H. Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology*, 121, 1/2, 21-32, 2004.
42. Carlotti D. Canine European leishmaniasis., 9 th FECAVA Congress, Scientific proceedings, Estrol, Portugal : 82, 2003.
43. Cavaliero T., Arnold P., Mathis A., Glaus T., Hofmann-Lehmann R., Deplazes P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med*, 13: 330-334, 1999.
44. Ciaramella P., Oliva G., De Luna R., Ambrosio R., Cortese L., Persechino A., Gradoni L., Scalone A.. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, 141: 539-543, 1997.
45. De Gorgolas M., Miles M. Visceral leishmaniasis and AIDS. *Nature*, 372:734, 1994.
46. Diaz-Espineira M., Slappendel R. A case of autochthonous canine leishmaniasis in The Netherlands. *Vet Q*, 19: 69-71, 1997.
47. Dujardin J., Campino L., Canavate C., Dedet J., Gradon L., Soteriadou K., Mazeris A., Ozbel Y., Boleaert M. Spread of Vectors-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 7:1013-1018, 2008.
48. Eisenberger C., Jaffe C.. Vaccines against Leishmaniasis. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, et al, ed. New Generation Vaccines, New York; Basel; 2004.
49. Faghih N., Mohebbi M., Javadian E. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Kordan, Tehran: 28, Pejouhandeh, 28, Summer 2002.
http://www.sbm.ac.ir/Journal/Pejouhandeh/Summer2002/pj28_13.htm
50. Ferroglio E., Maroli M., Gastaldo S., Mignone W., Rossi L. Canine Leishmaniasis, Italy. *Emerging Infectious Diseases*. 11, 10: 1618-1620, 2005.
51. Filipov. G., Getcheva G., Kostova T.. Epidemiological study of clinical cases of visceral Leishmaniasis in Bulgaria. *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, XXIV, 1997.
52. Fisa, R., Riera, C., Gallego, M., Manubens, J., Portus, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, 99:105-111, 2001.
53. Gállego M. Emerging parasitic zoonoses: leishmaniasis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 23, 2:661-676, 2004.
54. Ginel P., Lucena R., Lopez R., Molleda J. Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 39:271-274, 1998.
55. Gomez-Nieto. C. PhD thesis. Caceres University, 1990.
56. Gramiccia M, Gradoni L., Orsini S.. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol*, 86:613-620, 1992.

57. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol. Rev*, 14:229-243, 2001.
58. Haralambidis S. Κτηνιατρική Παρασιτολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 2001.
59. Harizanov R, Rainova I, Tzvetkova N, Kaftandjiev I, Bikov I, Mikov O. Geographical distribution and epidemiological characteristics of visceral leishmaniasis in Bulgaria, 1988 to 2012. *Euro Surveill* 18(29):20531, 2013
60. Jazic A., Zuko A., Cankovic M. Leishmaniasis in dogs in the area of Blagai (Mostar), Bosna-Herzegovina. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale*, Vol 3, 3-4: 59-60, 1998.
61. Keenan, C., Hendricks L., Lightner L., Johnson A. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. *Vet. Pathol.* 21: 80, 1984.
62. Kero A., Xinxo A. Epidemiological characteristics of Leishmaniasis in Albania in the period 1984-1996. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale*, 3, 3-4: 55-57, 1998.
63. Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M., Focheux C., Dereure J., Puech M., Cadièrgues M. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*, 11:105-111, 1997.
64. Killick-Kendrick R. Deltamethrin-impregnated dog collars (Scalibor protectband) protect dogs from sand fly bites. Abstract book, Worldleish 2, Crete, Greece – 20 to 24 May; 39, 2001.
65. Kontos V, A. Koutinas. Old world canine leishmaniasis. The Compendium of *Continuing Education* , 15:949-959, 1993.
66. Kontos V. Generalized canine leishmaniosis. Etiology-Epizootology-Pathogenesis-Clinical picture. 6-th Hellenic Congress in Small Animal Veterinary Medicine. Edition of the Hellenic Veterinary Medical Society, Athens, March: 543- 549, 2002.
67. Kontos V. Management of the Canine Leishmaniasis in an Endemic Area. WSAVA Proceedings, 2004.
68. Kostova T., Halacheva M., Likova N., Filipov G.. Seroepizootology study of dogs for leishmaniasis. *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, Vol 26, 2:14-15, 1998.
69. Koutinas A., Polizopoulou Z., Saridomichelakis M., Argyriadis D., Fytianou A., Plevrakiet K. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc*, 35:376-383, 1999.
70. Le Blancq S., Lanham S., Evans D. Comparative isoenzyme profiles of Old and New World *Leishmania*. In: Peters W and Killick-Kendrick R ed. The Leishmaniasis in Biology and Medicine, London: Academic Press, 543-551, 1987.
71. Lindsay D., Zajac A., Barr S., Leishmaniasis in American Foxhounds: An Emerging Zoonosis? *The Compendium of Continuing Education* , Vol 24, 4: 304-312, 2002.
72. Mancianti F, F. Pedonese, A. Poli. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol* , 65:1-9, 1996.
73. Martin-Sanchez, J., Lopez-Lopez, M.C., Acedo-Sanchez, C., Castro-Fajardo, J.J., Pineda, J.A., Morillas-Marquez, F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA, *Parasitology*, 122:607-615, 2001.
74. Mathis A, Deplazes P.. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol* , 33:1145-1149, 1995.

76. Maynard L., Woerly V., Sanquer A., Medaille C. Clinical efficacy of Miltrfisine oral solution in the treatment of canine leishmaniasis. PROCEEDINGS. World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA, Prague, 867-868, 2006.
77. Mikov O, Harizanov R. Distribution of the phlebotomine sandflies in Bulgaria and their importance as vectors of parasitic and viral diseases. 10th National Congress of Clinical Microbiology and Infections of the Bulgarian Association of Microbiologists, April 26 – 28, 2012, Plovdiv, Bulgaria. Book of abstracts: 47 – 48, 2012.
78. Muigai R., Gatei D, Shaunak S, Wozniak A, Bryceson A. Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis. *Lancet*, 2:476-479, 1983.
79. Mylonakis M. E., Saridomichelakis M. N. , Lazaridis V., Leontides L. S., P. Kostoulas, Koutinas A. F. A retrospective study of 61 cases of spontaneous canine epistaxis (1998 to 2001), *Journal of Small Animal Practice*, 49: 191–196, 2008.
80. Nieto C., Navarrete I., Habela M., Serrano F., Redondo E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 45:33-47, 1992.
81. Nieto C., Viñuelas J., Blanco A., Garsia-Alonso M., Verdugo S., Navarrete I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. *Vet Rec* 139:346-347, 1996.
82. Nuwayri-Salti N., Nasr R., Haddad K., Chamat S., Usta J. Canine leishmaniasis in northern Lebanon. *Ann Trop Med Parasitol*, 91:221-222, 1997.
83. Orndorff GR, Cooper BA, Smith W, Ryan JR. Canine visceral leishmaniasis in Sicily. *Mil Med*;165:29-32, 2000.
84. Otranto, Wall R. New strategies for the control of arthropod vectors of disease in dogs and cats. *Medical and Veterinary Entomology*, 22, 291–302, 2008.
85. Ozbel Y., Turgay N., Ozensoy S. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Ann Trop Med Parasitol* ,89 (Suppl 1):89-93, 1995.
86. Ozbel Y., Oskam L., Ozensoya S., Turgay N., Alkan M., Jaffe C., Ozcel M. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Tropica* 74 : 1–6, 2000.
87. Ozensoy S., Ozbel Y., Turgay N., Alkan M., Gul K., Gilman-Sachs A., Chang K., Reed S., Ozcel M. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*, 59:363-369, 1998.
88. Pantchev N, Schnyder M, Vrhovec M, Schape R, Tsachev I. Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria. *Parasitol Res*, 114:S111–S124, 2015.
89. Papadopoulou C., Kostoula A., Dimitriou D., Panagiotou A., Bobojianni C., Antoniadou G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in northwestern Greece. *Journal of Infection*, 50:53-60, 2005.
90. Petanides T.A., Koutinas A.F., Mylonakis M.E., Day M.J., Saridomichelakis M.N., Leontides L.S., Mischke R., Diniz P., Breitschwerdt E.B., Kritsepi M., Garipidou V.A., Koutinas C.K., Lekkas S. Factors Associated with the Occurrence of Epistaxis in Natural Canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med*, 22: 866–872, 2008.
91. Petkov G., Tchakurova P., Philipov G., Kairyakova B., Yovcheva V., Said M., Sivrev D., Tchakurov R., Yordanova D., Kostadinova E. Cases of visceral Leishmaniosis /Kala-Asar/ in children from the region of Stara Zagora, Bulgaria. ICOPA IX-9th international congress

of Parasitology, Makuhaki Messe, hiba, Japan, Edited by ISAO TADA SOMEI KOYIMA, MORIYASU TSUI , August 24-28, 1998.

92. Pugliese, A., Garofano, V., Pantano, V. and Niutta, P.P.,. Granuloma corneale da *Leishmania* nel cane. *Atti Societ`a Italiana delle Scienze Veterinarie*, 54:1391–1394,1990.
93. Pugliese, A., Niutta, P.P., Meli, F., Pantano, V. and Giudice, E., Incidenza delle lesioni oculari in corso di Leishmaniosi del cane. *Atti Societ`a Italiana delle Scienze Veterinarie*, 56: 1529–1533, 1992.
94. Pugliese, A., Niutta, P.P., Passantino, Catarsini, O. Lesioni granulomatoze del distretto ocular anteriore dell’occhio nella Leishmaniosi del cane. *Bollettino di Oculistica*, 75(S1), 615–623,1996.
95. Pugliese A., Di Pietro S., Giudice E. Clinical and Diagnostic Patterns of Leishmaniasis in the Dog, *Veterinary Research Communications*, 30(Suppl. 1) :39–43, 2006.
96. Quinnell, R.J., Courtenay, O., Davidson, S., Garcez, L., Lambson, B., Ramos, P., Shaw, J.J., Shaw, M.A.,Dye, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, 122:253-261,2001.
97. Rachamim N., Jaffe C., Abranches P., Silva-Pereira M., Schnur L., Jacobson R. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Ann Trop Med Parasitol*, 85:503-508, 1991.
98. Ramos J., Sarasa I., Ochoa P., Hernandez J., Larraga de Vera V., Ibacez M..Valuation of Two Types of Delivery of DNA Vaccines Against Canine Leishmaniasis. Proceedings WSAVA, 2002 <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings>
99. Reale. S., Maxia L., Vitale F., Glorioso N., Caracappa S., Vesco G.. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol* , 37:2931-2935, 1999.
100. Reithinger R., Davis C. Canine leish maniasis: novel strategies control. *Trends in Parasitology*, 18, 7: 289-290, 2002.
101. Rhalem A. Sahibi H., Guessous-Idrissi N., Lasri S., Natami A., Riyad M, Berrag B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*; 81:173-184,1999.
102. Ribeiro V.M., Rajao R.A., Diniz A.. Michalick M. Evaluation of the potential transmission of visceral leishmaniasis in a canine shelter. *Revue Med Vet*, 156, 1: 20-22, 2005.
103. Rotureau B., Ravel C., Aznar C., Carme B., Dedet J. First Report of *Leishmania infantum* in French Guiana: Canine Visceral Leishmaniasis Imported from the Old World. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 3:1120-1122, 2006.
104. Roura X., Fondevila D., Sanchez A., Ferrer L. Detection of *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* ,387, 1999.
105. Roze M.Canine Leishmaniasis: An Update in Diagnosis and Treatment. Proceedings WSAVA, 2003 <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings>
106. Sarasa J., Zarate J., Gomez P., Lucientes J., Castillo J., Rodriguez C.. Valuation of Three Technical Serodiagnostics for the Epidemic Study of *Leishmania Infantum* in the District of Ejea (Zaragoza). Proceedings WSAVA, 2002. <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings>.

107. Sideris V., Papadopoulou G., Dotsika E., Karagouni E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *European-Journal-of-Epidemiology*, 6, 15:271- 1999.
108. Slappendel R. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q*, 10:1-16, 1998.
109. Slappendel R., Ferrer L. Leishmaniasis. In: Greene C. ed. Infectious diseases of the dog and cat, Philadelphia: WB Saunders Co , 450-458, 1998.
110. Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39:560-563, 2001
111. 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 leishmaniasis. *Parasit Vectors*, 0;4:86, 2011
112. Sotira B. Zoonotic diseases of Major concern in Albania. Epidemiological overview. In: Inf. Circ.- WHO Mediterr. Zoon. Control Cent., 49:6-8, 2000.
113. Strauss-Ayali D. and G. Baneth. Canine Visceral Leishmaniasis. In: Recent Advances in Canine Infectious Diseases, Carmichael L. (Ed.), 2001.
http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/baneth/chapter_frm.asp
114. Strauss-Ayali D., B.Sandler, C.Jaffe, L.Eisenberger, S.Harrus and G. Baneth. A seroepidemiological study of canine visceral leishmaniasis in Israel. Abstract book, Worldleish 2, Crete, Greece – 20 to 24 May; 41, 2001.
115. Stefanovski S., Stefanovska J., Hristovski N. Current status of Parasitology. Makedonia. Parasitology days in Bulgaria, Stara Zagora 11-14 June: 20-22, 2008.
116. Swenson CL, Silverman J, Stromberg PC, et al. Visceral leishmaniasis in an English foxhound from an Ohio research colony. *J Am Vet Med Assoc*, 193:1089-1092, 1998.
117. Torres F., Brito M., Brandão-Filho S. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140, 1-2, 31: 54-60, 2006.
118. Tsachev I., Kyriazis I., Karagouni E., Boutsini. S., E. Dotsika. First Report of Canine Visceral Leishmaniasis in Bulgaria. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 34, 5: 465-469, 2010.
119. Tsachev I. It is the microbe who will have the last word? ISC 20 years FVM, University of Forestry, Abstract book, Yundula, Bulgaria:18, 2014
120. Tsachev I. CoI (Co-infections) are VIP (Vector Infections in Patients): animals and/or...vets? X National meeting of Infectious Diseases, Book of Abstracts, Triyvna, Bulgaria, 2015.
121. Tsachev I. Our Alphabet: A, B, C, D, E, H, I, L, V, Z (Anaplasmoses, Boreliososes/Babesioses, Co-Infections, Dirofilarioses, Erlichioses, Hosts, Infections, Leishmanioses, Vectors, Zoonoses etc.), 8-th Scientific conference of the Bulgarian Focal point of EFSA, Sofia, Bulgaria, 2015.
122. Vercammen F., D. Berkvens , D. Le Ray , D. Jacquet and T. Vervoort ClinChem. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. *Vet Rec*, 141:328-330, 1997.

123. Zaffaroni E., P. Rubaudo, L. Anfranchi, W. Mignone. Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). *Vet Parasitology*, 81:11-19, 1999.
124. Zatelli A, Borgarelli M, Santili R, Bonfanti U, Nigrisoli E, Zanatta R, Tarducci A, Guarraci A. et al.. Glomerular lesions in dogs infected with Leishmania organisms. *Am J Vet Res* 64:558-561, 2003.
125. Zivcnjak T, Martinković F, Marinculić A, Mrljak V, Kucer N, Matijatko V, Mihaljević Z, Barić-Rafaj R. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet Parasitol*, 131(1-2):35-43, 2005.