LEISHMANIA

Western blot IgG

AUTORISE

CE

Immunoblot-Assay für die *In-vitro*-Diagnostik

#LES-WB24G : 24 tests
#LES-WB12G : 12 tests
#LES-WB96G : 96 tests

GEBRAUCHSANWEISUNG

Verwendungszweck

LEISHMANIA Western blot (WB) IgG ist ein qualitativer Test der serologischen IgG-Diagnose mittels Immunoblot-Assay auf Leishmaniose, der als Bestätigungstest bei einem positiven oder mehrdeutigen Ergebnis in klassischen Screeningtests vorgesehen ist.

Testprinzip

Westernblot-Technik: Die Antigene (promastigote Form von *Leishmania infantum*) werden nach der Trennung durch Elektrophorese mittels Elektroblotting an die Oberfläche einer Nitrocellulosemembran gebunden (Transfer genannt), die in 24 von 1 bis 24 nummerierte Streifen geschnitten wird.

Durchführung des Tests**:** Jede zu prüfende Serumprobe wird separat mit einem Streifen inkubiert. Die potenziell in der Probe vorhandenen Anti-*Leishmania*-Antikörper binden selektiv an die Antigene von *L. infantum*. Das alkalische Phosphatase Anti-Human-IgG-Konjugat bindet dann an die gebundenen Anti-*Leishmania*-Antikörper. Abschließend reagieren die Immunkomplexe mit dem Substrat. Die in den Proben vorhandenen, von den Anti-*Leishmania*-Antikörpern erkannten Antigene vom Typ IgG werden als violette querverlaufende Banden dargestellt.

Im Kit enthaltene Reagenzien

kursiv: Packung mit *12 Tests (#LES-WB12G)* - **fett:** Packung mit **96 Tests (#LES-WB96G)**.

ID	Menge	Beschreibung	Zusammensetzung
R1	1	Block/Blöcke mit 24 (*12*, **4 x 24**) STREIFEN: vorgeschnittener + gefärbter Standard. (Jeder Block und jeder Transfer sind mit einer eigenen einzigartigen Seriennummer gekennzeichnet)	Sensibilisierte Nitrocellulose. Gefärbtes Molekulargewicht (kDa): Blau: 250, Blau: 150, Blau: 100, Rosa: 75, Blau: 50, Grün: 37, Rosa: 25, Blau: 20, Blau: 15, Gelb: 10.
R2	1	Fläschchen mit 30 (*30*, **125**) ml PROBENPUFFER (Gebrauchsfertig – rosafarbene Lösung).	Puffer + Tensid + NaN3 (< 0,1 %).
R3	1	Fläschchen mit 30 (*30*, **2 x 60**) ml ANTI-IgG-KONJUGAT (Gebrauchsfertig – blaue Lösung).	Puffer + anti-humane IgG polyklonale Ziegensera konjugiert mit alkalischer Phosphatase + NaN3 (< 0,1 %) + Stabilisatoren.
R5	1	Fläschchen mit 30 (*30*, **125**) ml SUBSTRAT (Gebrauchsfertig – opakbraunes Fläschchen).	Puffer + NBT + BCIP + Stabilisatoren.
R6	1	Fläschchen mit 60 (*60*, **250**) ml WASCHKONZENTRAT 10X PUFFER (Muss in destilliertem Wasser 10-fach verdünnt werden – farblose Lösung).	Puffer + Tensid + NaN3 (< 0,1 %).
R10	1	Röhrchen mit 200 (*200*, **2 x 200**) µl POSITIVEM KONTROLLSERUM (Gebrauchsfertig – rote Kappe).	Puffer + Sammelprobe von Humanseren mit positiver *Leishmania*-Serologie + NaN3 (< 0,1 %) + Stabilisatoren.

R2, R3, R5 und R6 sind Bestandteil aller Kits und weisen eine eigene einzigartige Chargennummer auf, die nur vom jeweiligen Produktionsdatum abhängt. Es wird die Durchführung von Multiparameterserien empfohlen (siehe Immunoblot-Bandbreite von LDBIO), um die Anzahl geöffneter Fläschchen zu begrenzen und eine bessere Qualitätskontrolle zu erreichen.

Zusätzlich erforderliches Material, das nicht im Lieferumfang enthalten ist

- Multikanal-Polypropylen-Inkubationswannen für Mini-Blots (#WBPP-08 oder gleichwertig).
- Wippschüttler für Immunoblots, Vakuumsystem für Flüssigkeiten (die von uns gelieferten #WBPP-08-Wannen können durch einfaches Umdrehen geleert werden).
- Röhrchen und Material zur Probenahme, Messzylinder, angepasste Behälter. Automatische Pipetten, Mikropipetten und Einwegspitzen (Mengen von 25 µl, 1,2 ml und 2 ml).
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser. Saugpapier (z. B. Whatman Filterpapier), transparentes Klebeband.
- Latexhandschuhe, Pinzetten zur Handhabung der Streifen, Cutter oder Skalpell, flaches transparentes Lineal.

Hinweis: Unsere Reagenzien können in einem automatisierten Immunoblot-Prozessor verwendet werden. **Es sollte darauf geachtet werden, dass keine chemischen Kontaminationen unserer Reagenzien auftreten, wenn im Prozessor auch Reagenzien anderer Hersteller verwendet werden** (bekanntes Beispiel: Kontamination durch TWEEN 20), und keine bakteriellen Kontaminationen. Fläschchen für den Prozessor reservieren. Nach der Verarbeitung dürfen Reste verwendeter Reagenzien nicht zurück in die Originalfläschchen gegeben werden.

Lagerung und Stabilität

Zwischen 2 und 8 °C lagern. Die Reagenzien des Kits sind bis zum auf der Außenverpackung und den Fläschchenetiketten angegebenen Ablaufdatum stabil. 1/10 verdünnter Waschpuffer bleibt bei +2 bis +8 °C zwei Monate und bei Raumtemperatur eine Woche stabil.

Warnhinweise für den Gebrauch

Sicherheit

- Nur für *In-vitro*-Anwendung. Entsprechend der Guten Laborpraxis handhaben und jedes Reagenz und jede Probe als potenziell toxisch und/oder infektiös behandeln.
- Laborkittel, Handschuhe und Brille tragen; im Labor nicht trinken, essen oder rauchen. Pipetten nicht mit dem Mund handhaben.
- Eine positive Kontrolle ist ein Serum humanen Ursprungs, das geprüft und negativ auf HIV 1- und HIV 2-Antikörper, HCV-Antikörper und HB-Antigen getestet wurde. Trotzdem muss sie wie ein potenziell infektiöses Produkt behandelt werden.
- Das Substrat enthält eine Mischung aus NBT und BCIP und wirkt bei Kontakt (Haut und Schleimhäute) und Inhalation toxisch.
- Die Reagenzien enthalten Natriumazid, das mit Blei und Kupfer explosive Metallsalze bilden kann. Verschüttungen mit Wasser reinigen.
- Abfall (Proben, Spitzen, Röhrchen, Waschflüssigkeit, gebrauchtes Reagenz...) gemäß guter Praxis der Branche und aktuellen nationalen Bestimmungen entsorgen.

Vorsichtsmaßnahmen

- Keine flüssigen Reagenzien aus verschiedenen Chargen zusammen verwenden.
- Die Streifen in numerischer Reihenfolge verwenden. Streifen mit verschiedener Seriennummer nicht mischen; die Transfers der Reihe nach verwenden. Vor Testbeginn sollte ein spezifischer Aufteilungsplan erstellt werden.
- Die Streifen nicht mit den Fingern berühren; eine Pinzette verwenden.
- Die Reagenzien müssen vor der Verwendung gut vermischt werden, insbesondere der konzentrierte Waschpuffer.
- Die Fläschchen nach der Verwendung verschließen; nicht verwenden, wenn versehentlich eine Substanz in die Reagenzien gelangt ist. Reagenzien aus Fläschchen, die Anzeichen ausgelaufenen Materials aufweisen, nicht verwenden. Trübe oder ausgefällte Lösung nicht verwenden.
- Nur Einwegpipettenspitzen verwenden. Kontamination zwischen den Kanälen vermeiden. Darauf achten, ob sich in den Pipettenspitzen Schaum oder Bläschen bilden (bakterielle Kontamination der Reagenzfläschchen).
- Inkubationswannen nur mit klarem Wasser reinigen, gefolgt von destilliertem Wasser (niemals Detergenzien oder Bleichmittel verwenden).
- Das Auslassen einer Probe oder die Zugabe einer ungeeigneten Menge kann unabhängig vom tatsächlichen Status zu einem negativen Testergebnis führen.

Probenahme

Die Proben aseptisch in trockenen Röhrchen sammeln. Es sind mindestens 25 µl Serum.
Die Proben bis zur Verarbeitung bei 2-8 °C aufbewahren. Wenn sie gelagert werden müssen, die Proben bei -20 ± 5 °C einfrieren. Keine kontaminierten Proben verwenden. Die Proben dürfen nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.

Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer: Für 4 Tests in einer sauberen Flasche müssen 10 ml Waschkonzentrat 10X **(R6)** in 90 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnt werden.

Testverfahren

Anmerkung: Es wird die Durchführung von Multiparameterserien empfohlen (siehe Immunoblot-Bandbreite von LDBIO), um die Anzahl geöffneter Fläschchen zu begrenzen und eine bessere Qualitätskontrolle zu erreichen.

1. Für die Proben und C+ positiven Kontrollen muss ein Aufteilungsplan erstellt werden **(R10)**.
   Nur durch Anwendung dieser Kontrolle kann der Test technisch validiert und eine Identifikation der spezifischen entwickelten Banden für eine bestimmte Seriennummer festgestellt werden. Ein C+ Streifen kann nicht verwendet werden, um die Ergebnisse von Streifen eines Blots einer anderen Seriennummer zu interpretieren.

2. Mit einem Skalpell und einem sauberen und trockenen, flachen, transparenten Lineal die erforderliche Anzahl Streifen (R1) zurechtschneiden, wobei die blaue Positionierungslinie auf den Streifen erhalten bleibt: die Streifen mit dem Lineal festhalten und auf der Seite mit dem Stamm schneiden (die Nummern sind durch das Lineal zu sehen).

3. 1,2 ml des Probenpuffers (R2) gemäß dem erstellten Plan in jeden Kanal verteilen.

4. Die nummerierten Streifen in numerischer Reihenfolge in den Kanälen platzieren: Die Streifen für ca. 1 Minute mit oben sichtbarer Nummer rehydrieren lassen. Hierzu wird die Wanne leicht geschwenkt, damit sie vollständig in den Puffer eintauchen.

5. Proben und positive Kontrolle(n) verteilen: gemäß Aufteilungsplan mit 25 µl pro Kanal. Die Wanne nach jeder Dosierung leicht schütteln. Die Wanne auf einen Wippschüttler stellen. **Für 90 Min.** ± 5 Min. bei 18-25 °C inkubieren.

6. Waschschritt: Den Inhalt des Kanals mit einer Pasteurpipette oder durch Umdrehen der Inkubationswanne entleeren. 2 bis 3 ml verdünnten Waschpuffer in jeden Kanal geben. Auf dem Wippschüttler für 3 Min. inkubieren. Zweimal wiederholen, dann den Inhalt der Kanäle entleeren. Sicherstellen, dass sich die Streifen während dieser Schritte nicht umdrehen.

7. 1,2 ml eines Anti-IgG-Konjugats (R3) in jeden Kanal geben. Die Wanne auf den Wippschüttler stellen. **Für 60 Min.** ± 5 Min. bei 18-25 °C inkubieren.

8. Waschschritt: Schritt 6 wiederholen.

9. 1,2 ml NBT/BCIP-Substrat (R5) in jeden der Kanäle geben. Auf den Wippschüttler stellen und vor direkter Lichteinstrahlung schützen. **Für 60 Min.** ± 5 Min. bei 18-25 °C inkubieren.

   Unabhängig vom Parameter die Farbentwicklung überwachen. Die Entwicklung kann beendet werden, wenn die Hintergrundfarbe des Streifens so dunkel wird, dass Ablesen schwierig wird (die Qualität der Waschschritte hat einen grundlegenden Einfluss auf die Einfärbung des Hintergrunds). Es muss beachtet werden, dass die Streifen beim Trocknen heller werden.

10. Die Reaktion wird durch Absaugen des Substrats mit einer Pasteurpipette oder Umdrehen der Inkubationswanne und Hinzufügen von 2 ml destillierten Wassers in die Kanäle gestoppt. Dieser letzte Waschschritt wird noch einmal wiederholt.

11. Trocknen der Streifen: Während die Kanäle noch mit Wasser gefüllt sind, werden die Streifen mit der

Pinzette am nummerierten Ende herausgenommen und so, dass die Nummer sichtbar ist, auf Whatman Saugpapier gelegt. An der Luft trocknen lassen. Die Farbe der Streifen wird beim Trocknen natürlicherweise heller. Die Auswertung darf erst stattfinden, wenn die Trocknung abgeschlossen ist.

12. Lagerung: Die Streifen auf ein Blatt Papier legen, auf dem sie archiviert werden. Die Positionslinien ausrichten. Die Streifen werden mit dem flachen Lineal fixiert und oben an den Streifen transparentes Klebeband angebracht.

Für eine gute Auswertung müssen die Streifen nach Transfer und in ihrer numerischen Reihenfolge mit einem maximalen Abstand von ein paar Millimetern angeordnet sein. Der Vergleich von Streifen mit großem Abstand (z. B. Nr. 2 mit Nr. 15) ist unzuverlässig. **Es ist gefährlich** (aufgrund falscher Ergebnisse), Streifen aus verschiedenen Kits (mit verschiedenen Seriennummern) miteinander zu vergleichen.

Qualitätskontrolle und Auswertung

Die im Kit vorhandene Serumkontrolle (R10) muss systematisch in alle Immunoblotserien integriert werden. Sie zeigt das typische Profil und ermöglicht die technische Validierung einer guten Testdurchführung (di Banden müssen auf dem Streifen sehr deutlich erscheinen) und die präzise Kalibrierung der Position und Aspekte der spezifischen Banden für die Auswertung der Ergebnisse von Streifen desselben Transfers (gleiche Seriennummer).

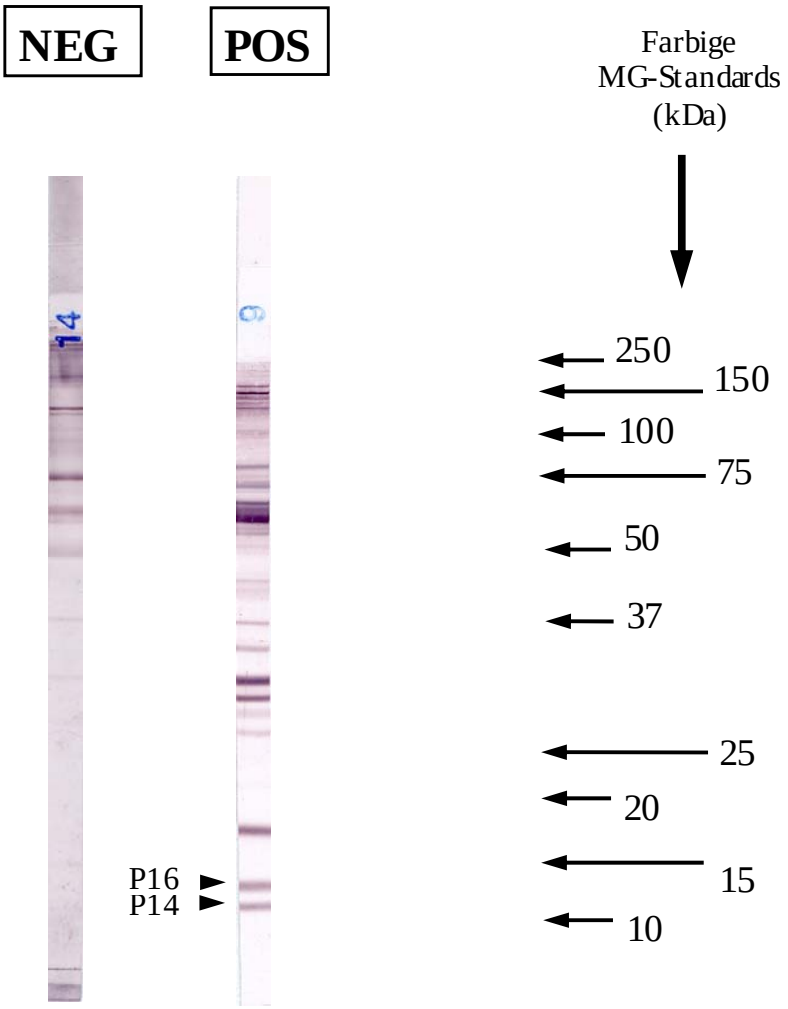

Abb. 1: Beispiele positiver und negativer Ergebnisse

- Beschreibung der Banden:

Eine positive Probe kann zahlreiche Bänder zwischen 8 und 200 kDa (Kilodalton) aufweisen. Manche von ihnen sind Leishmaniose-spezifisch [9]. Jedoch wird ihre Auswertung durch die Schwierigkeit, sie innerhalb der anderen Bänder mit ungewisser Spezifität zu erkennen, behindert.

Überprüfen jeder getesteten Probe auf Vorhandensein von Bändern im Bereich 14 und 16 kDa mithilfe der oben beschriebenen Kalibrierungsinstrumente. Diese im unteren Teil des Streifens befindlichen Bänder, die normalerweise deutlich isoliert sind, können im Allgemeinen leicht ausgewertet werden.

- Auswertung:

Das Vorhandensein des 14 kDa und /oder 16 kDa Antigen-Bandes auf dem Streifen ermöglicht die Einstufung des Testes als positiv und die Schlussfolgerung auf das Vorhandensein von Anti-Leishmania-IgG-Antikörpern in der geprüften Probe. (Das oben dargestellte positive Ergebnis wurde durch Verwendung der im Kit mit gelieferten positiven Kontrolle **R10** erzielt.)

Zur Validierung der Ergebnisse muss immer das Profil des Immunoblots jeder Probe mit dem der positiven Kontrolle R10 verglichen werden. Die Aspekte der Banden sind für die Auswertung des Tests wichtig.

Anwendungsbeschränkungen

Diese serologischen Ergebnisse müssen anhand der vorhandenen Informationen (epidemiologisch, klinisch, Bildgebung, biologisch) ausgewertet werden, um eine Diagnose zu erhalten.
Ein negatives serologisches Ergebnis schließt die Diagnose einer viszeralen Leishmaniose nicht aus, insbesondere bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem.
Jeder Verdacht auf Leishmaniose muss automatisch die Durchführung einer parasitologischen Analyse auf Protozoen veranlassen.

Leistung

Der Test LEISHMANIA WB IgG war Gegenstand einer Vergleichsstudie in einem unabhängigen Labor, bei der er den Verfahren IFA und ELISA gegenübergestellt wurde.

- Sensitivität:

	IFA	ELISA	WB
POSITIV	41	40	51
NEGATIV	10	11	0

Tabelle 1: 51 Serumproben von Patienten mit einer fortschreitenden viszeralen Leishmaniose wurden durch die 3 Verfahren geprüft. Die Verfahren ELISA und IFA lieferten falsch negative Ergebnisse, insbesondere bei den Patienten mit geschwächtem Immunsystem (HIV).

	IFA	ELISA	WB
POSITIV	0	0	15
NEGATIV	20	20	5

Tabelle 2: 20 Serumproben von gesunden Probanden, die in einem Endemiegebiet leben und einen positiven Hautsensibilitätstest aufwiesen, wurden parallel durch die drei Verfahren geprüft: Die Sensitivität der Verfahren IFA und ELISA ist unzureichend, um sehr geringe Antikörper-Konzentrationen zu erkennen.

- Spezifität:

	IFA	ELISA	WB
POSITIV	0	0	0
NEGATIV	30	30	30

Tabelle 3: 30 Serumproben von gesunden erwachsenen Probanden, die nicht in einem Endemiegebiet leben, wurden parallel durch Immunoblot-Assay und durch die Verfahren Elisa und IFA in einem unabhängigen Labor geprüft: Die Spezifität der drei Verfahren lag bei 100%. *Anmerkung: Falsch positive Reaktionen werden häufig unabhängig vom angewandten Verfahren bei Patienten mit Trypanosomiasis (T. cruzi) vorgefunden.*

- Reproduzierbarkeit:

Es wurde die Reproduzierbarkeit zwischen Serien und Chargen geprüft. In beiden Fällen ist die Korrelation hinsichtlich der spezifischen Banden zwischen Sera sehr gut.

- Beeinträchtigung:

Obwohl keine besondere Kreuzreaktion mit hämolysierten, ikterischen oder lipidischen Sera beobachtet wurde, wird empfohlen, die Ergebnisse der Verwendung solcher Proben aufmerksam zu beobachten.

Fehlerbehebung

„Die Banden sind blass und weisen kaum Kontrast auf“: Bestimmte Sera mit niedrigen Konzentrationen von Antikörpern können solche Ergebnisse zeigen.
„Es sind schattierte Bereiche sichtbar, mehr oder weniger farbig, leicht diffus“: Der Streifen wurde in eins der Reagenzien nicht vollständig eingetaucht und wurde nicht über seine gesamte Länge korrekt inkubiert. Es können auch Flecken an den Stellen vorhanden sein, an denen die Probe platziert wurde, wenn die Wanne anschließend nicht geschüttelt wurde.

„Der Hintergrund ist dominant, wodurch das Ablesen sehr schwer wird“: Die Waschungen waren unzureichend oder die letzte Inkubation zu lang. Gute Techniken zur Testleistung sicherstellen, die Waschzeiten einhalten und die Wasserqualität sicherstellen. Die Zeit der letzten Inkubation reduzieren. In Ausnahmefällen können bestimmte Sera unspezifisch reagieren. Dann ist das Ergebnis des Immunoblots unbrauchbar.
Dieser unspezifische, dominante Hintergrund kann nur einen Teil des Streifens betreffen und somit können nur hier die Ergebnisse nicht ausgewertet werden.

„Während des letzten Entwicklungsschritts erscheint eine Ausfällung in der Lösung“: das Substrat kann tatsächlich zum Ende der Entwicklung im Puffer teilweise ausfällen (schwarze Flocken). Dieses Phänomen verändert die Qualität der Entwicklung nicht, die normal fortgesetzt werden sollte. Die letzte Waschung mit destilliertem Wasser entfernt möglicherweise vorhandene feste Partikel.

Literaturverzeichnis

Aoun, Olivier, Charles Mary, Cédric Roqueplo, Jean-Lou Marié, Olivier Terrier, Aurélie Levieuge, et Bernard Davoust. 2009. « Canine Leishmaniasis in South-East of France: Screening of Leishmania Infantum Antibodies (western Blotting, ELISA) and Parasitaemia Levels by PCR Quantification ». *Veterinary Parasitology* 166 (1-2): 27‑31. doi:10.1016/j.vetpar.2009.08.006.

Biglino, A., C. Bolla, E. Concialdi, A. Trisciuoglio, A. Romano, et E. Ferroglio. 2010. « Asymptomatic Leishmania Infantum Infection in an Area of Northwestern Italy (Piedmont Region) Where Such

Infections Are Traditionally Nonendemic ». *Journal of Clinical Microbiology* 48 (1): 131‑36. doi:10.1128/JCM.00416-09.

Cota, Gláucia Fernandes, Marcos Roberto de Sousa, Fábio Nogueira Demarqui, et Ana Rabello. 2012. « The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (5): e1665. doi:10.1371/journal.pntd.0001665.

Deniau, M., C. Cañavate, F. Faraut-Gambarelli, et P. Marty. 2003. « The Biological Diagnosis of Leishmaniasis in HIV-Infected Patients ». *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 97 (Supplement-1): 115‑33. doi:10.1179/000349803225002598.

Ferroglio, E., E. Centaro, W. Mignone, et A. Trisciuoglio. 2007. « Evaluation of an ELISA Rapid Device for the Serological Diagnosis of Leishmania Infantum Infection in Dog as Compared with Immunofluorescence Assay and Western Blot ». *Veterinary Parasitology* 144 (1-2): 162‑66. doi:10.1016/j.vetpar.2006.09.017.

Kallel, K, L Ammari, E Kaouech, S Belhadj, S Anane, B Kilani, et E Chaker. 2007. « [Asymptomatic bearing of Leishmania infantum among Tunisian HIV infected patients] ». *Pathologie-biologie* 55 (10): 521‑24. doi:10.1016/j.patbio.2007.07.017.

Lachaud, L., J. P. Dedet, P. Marty, F. Faraut, P. Buffet, J. P. Gangneux, C. Ravel, P. Bastien, et Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France. 2013. « Surveillance of Leishmaniases in France, 1999 to 2012 ». *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 18 (29): 20534.

Marty, P., A. Lelievre, J. F. Quaranta, A. Rahal, M. Gari-Toussaint, et Y. Le Fichoux. 1994. « Use of the Leishmanin Skin Test and Western Blot Analysis for Epidemiological Studies in Visceral Leishmaniasis Areas: Experience in a Highly Endemic Focus in Alpes-Maritimes (France) ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88 (6): 658‑59.

Marty, P., A. Lelièvre, J. F. Quaranta, I. Suffia, M. Eulalio, M. Gari-Toussaint, Y. Le Fichoux, et J. Kubar. 1995. « Detection by Western Blot of Four Antigens Characterizing Acute Clinical Leishmaniasis due to Leishmania Infantum ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89 (6): 690‑91.

Mary, C., D. Lamouroux, S. Dunan, et M. Quilici. 1992. « Western Blot Analysis of Antibodies to Leishmania Infantum Antigens: Potential of the 14-kD and 16-kD Antigens for Diagnosis and Epidemiologic Purposes ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47 (6): 764‑71.

Pomares, Christelle, Laura Despierres, Pascal del Giudice, Pascal Delaunay, Grégory Michel, Bernard Ferrua, et Pierre Marty. 2012. « Western Blot Analysis as an Aid for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis due to Leishmania Major ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106 (7): 452‑54. doi:10.1016/j.trstmh.2012.03.001.

Ready, Paul. 2014. « Epidemiology of Visceral Leishmaniasis ». *Clinical Epidemiology*, mai, 147. doi:10.2147/CLEP.S44267.

Saghrouni, F, I Khammari, N Kaabia, J Bouguila, J Ben Abdeljelil, A Fathallah, F Amri, et M Ben Saïd. 2011. « Asymptomatic carriage of Leishmania in family members of patients with visceral leishmaniasis in Central Tunisia ». *Pathologie-biologie*, décembre. doi:10.1016/j.patbio.2011.11.001.

Solano-Gallego, Laia, Guadalupe Miró, Alek Koutinas, Luis Cardoso, Maria Grazia Pennisi, Luis Ferrer, Patrick Bourdeau, Gaetano Oliva, Gad Baneth, et null The LeishVet Group. 2011. « LeishVet Guidelines for the Practical Management of Canine Leishmaniosis ». *Parasites & Vectors* 4: 86. doi:10.1186/1756-3305-4-86.

Van Griensven, J., E. Carrillo, R. López-Vélez, L. Lynen, et J. Moreno. 2014. « Leishmaniasis in Immunosuppressed Individuals ». *Clinical Microbiology and Infection* 20 (4): 286‑99. doi:10.1111/1469-0691.12556.