

Lišmenioza u Hrvatskoj : rasprostranjenost i parazitološka dijagnostika klinički simptomatskih i nesimptomatskih infekcija

Šiško Kraljević, Katarina

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:251218>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Katarina Šiško Kraljević

**LIŠMENIOZA U HRVATSKOJ – RASPROSTRANJENOST I
PARAZITOLŠKA DIJAGNOSTIKA KLINIČKI SIMPTOMATSKIH I
NESIMPTOMATSKIH INFEKCIJA**

Doktorska disertacija

Split, 2014.

Ovaj rad dijelom je izrađen u Kliničkom zavodu za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju, Kliničkog bolničkog centra Split, a dijelom u Istituto superiore di sanità (Nacionalom institutu za zdravlje), u Rimu, u Italiji.

Rad je izrađen u okviru znanstvenog projekta „Patogeni koje prenose člankonošci u južnoj Hrvatskoj“ (šifra projekta 216-0481153-1148).

Voditelj rada: prof. dr. sc. Volga Punda-Polić

ZAHVALE

Od srca zahvaljujem mentorici prof. Volgi Punda-Polić, na silnom trudu, strpljenju i podršci.

Ovaj rad ne bi bio moguć bez nesebične pomoći brojnih suradnika koji su pomogli u prikupljanju i obradi podataka i uzoraka.

Stoga želim zahvaliti kolegicama Odjela za citologiju KBC-a Split, koje su ljubazno ustupile mikroskopske preparate iz svoje arhive, te kolegama infektolozima koji su mi omogućili pristup podacima o bolesnicima liječenim u Odjelu za zarazne bolesti KBC-a Split.

Voditelji i djelatnici laboratorija iz čitave Hrvatske pomogli su nam u prikupljanju uzoraka i podataka za serološki dio istraživanja, pa stoga iskreno zahvaljujem: dr. Marini Payerl-Pal i dr. Biserki Jelenić-Poje iz Čakovca, dr. Mirni Ladavac i dr. Jasmini Kučinar iz Pule, prof. dr. Borisu Dželaliji iz Zadra, dr. Editi Sušić iz Šibenika, mag. Steli Tomić, mag. Ivani Delić i dr. Elmicu Borzić iz Splita, mag. Renati Jurić sa Hvara, mag. Ani Galović iz Supetra, mag. Tatjani Barčot iz Vele Luke, mag. Miri Kevo iz Metkovića i dr. Paulu Bohnert iz Dubrovnika. Nadalje, hvala Bojani Mohar, ing. mikrob. i Marini Luketin, za pomoć u serološkom dijelu istraživanja.

Također zahvaljujem prof. Marini Gramicia i dr. Trentini Di Muccio za gostoprimstvo i pomoć u molekularnom dijelu istraživanja. Nadalje, hvala dr. sc. Ani Kovačić na pomoći u uvođenju molekularne dijagnostike.

U sređivanju i interpretaciji dobivenih podataka nemjerljiva je bila pomoć dr. sc. Ane Jerončić i na tome joj hvala. Za pomoć oko uređivanja slika zahvaljujem svom bratu Ivi Šišku.

Također želim zahvaliti kolegicama i kolegama iz Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije i ravnateljici dr. Jasni Ninčević, kao i bivšem ravnatelju dr. Mladenu Smoljanoviću na njihovoj potpori.

Mojim roditeljima Vinku i Jeleni

SADRŽAJ

TUMAČ KRATICA I ZNAKOVA

1. UVOD.....	1
1.1. Lišmenioze – klinička slika.....	3
1.2. Dijagnostika lišmenioza.....	5
1.3. Lišmenioze – epidemiologija.....	9
1.4. Lišmenioze u Hrvatskoj.....	11
2. CILJEVI.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Molekularna detekcija i identifikacija lišmenija u arhiviranim mikroskopskim preparatima različitih kliničkih uzoraka.....	16
3.1.1. Prikupljanje uzoraka za molekularnu dijagnostiku.....	16
3.1.2. Izolacija DNK iz bioloških materijala.....	18
3.1.3. Dijagnostički SSU-PCR protokol.....	18
3.1.4. Identifikacijski ITS1-PCR protokol.....	21
3.1.5. Analiza raznolikosti duljina restrikcijskih fragmenata (PCR-RFLP).....	23
3.2. Serološka dijagnostika: pretraga uzoraka seruma na prisutnost protutijela nastalih kao odgovor na infekciju s lišmenijom.....	23
3.2.1. Serološka dijagnostika – uzorci.....	23
3.2.1.1. Uzorci za seroepidemiološko ispitivanje.....	24
3.2.1.2. Uzorci obiteljskih kontakata.....	26
3.2.2. Serološka dijagnostika – postupci.....	26
3.2.2.1. Enzimski imuno test (ELISA).....	26
3.2.2.2. Test neizravne imunofluorescencije (IFA).....	28
3.2.2.3. Test neizravne hemaglutinacije (IHA).....	29
3.3. Statistička obrada podataka.....	30
4. REZULTATI.....	31
4.1. Molekularna dijagnostika lišmenioza iz arhiviranih mikroskopskih preparata... 31	
4.1.1. Zbirka uzoraka arhiviranih mikroskopskih preparata i osnovne karakteristike ispitanika kojima su pripadali uzorci	31

4.1.2. Dijagnostički SSU-PCR protokol.....	36
4.1.3. Identifikacijski ITS1-PCR protokol.....	39
4.2. Istraživanje seroprevalencije lišmenioze u asimptomatskoj populaciji Hrvatske.....	41
4.3. Testiranje obiteljskih kontakata bolesnika te dijagnosticiranje novooboljelih.....	47
5. RASPRAVA.....	48
6. ZAKLJUČAK.....	55
7. SAŽETAK.....	56
8. SUMMARY.....	57
9. POPIS LITERATURE.....	58
10. ŽIVOTOPIS.....	69

TUMAČ KRATICA I ZNAKOVA

- Bp - parovi baza (engl. *base pairs*)
- CanL – lišmenioza pasa
- CI - raspon pouzdanosti (engl. *confidence interval*)
- CL – kožna lišmenioza
- DAT - izravni aglutinacijski test (engl. *direct agglutination*)
- DMSO – dimetil sulfoksid
- DNK – deoksiribonukleinska kiselina
- dNTP – deoksinukleotid tri-fosfat
- ELISA – enzimski imuno test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- HAART - visoko učinkovita antiretrovirusna terapija (engl. *highly active antiretroviral therapy*)
- *Hae* III – treća endonukleaza izolirana iz *Haemophilus aegyptius*
- HIV- virus humane imunodeficijencije
- HRP - peroksidaza hrena (engl. *horseradish peroxidase*)
- HSP 70 – proteini toplinskog šoka veličine 70 kilodaltona (engl. *heat shock proteins*)
- IHA - test neizravne hemaglutinacije (engl. *indirect haemagglutination*)
- IFA – test neizravne imunofluorescencije (engl. *indirect immunofluorescence assay*)
- ITS1 – unutrašnja prepisana razmaknica 1, područje je koje razdvaja ssu rRNK i 5.8S rRNK gene u ribosomalnom operonu različitih vrsta lišmenija (engl. *internal transcribed spacer 1*)
- KBC – klinički bolnički centar
- kDNK - deoksiribonukleinska kiselina kinetoplasta
- MM – bazična mješavina (engl. *master mix*)
- MLEE – multilokusna enzimaska elektroforeza (engl. *multilocus enzyme electrophoresis*)
- NNN – hranjiva podloga za uzgoj lišmenija nazvana po autorima (Novi, McNeal, Nicole)

- NZJZ – nastavni zavod za javno zdravstvo
- OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*)
- PBS – puferirana otopina soli (engl. *phosphate buffered solution*)
- PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)
- PKDL - postkalaazarna kožna lišmenioza (engl. *post kala-azar dermal leishmaniasis*)
- RFLP – polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism*)
- rK39 - rekombinantni proteinski derivat antigena *Leishmania donovoni* izolata
- RPM – broj okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*)
- Sb - stiboglukonat
- SSU-rRNA – mala podjedinica ribosomalne ribonukleinske kiseline (engl. *small subunit ribosomal RNA*)
- SCL - suspektna kožna lišmenioza
- SVL – suspektna visceralna lišmenioza
- TBE – Tris-borat-EDTA, pufer sastavljen od tris (hidroksimetil) aminometana, borne i etilen diamin tetraoctene kiseline
- TE pufer – Tris-EDTA, pufer sastavljen od tris (hidroksimetil) aminometana i etilen diamin tetraoctene kiseline
- TNF - čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)
- VL – visceralna lišmenioza
- VLR – recidiv visceralne lišmenioze
- χ^2 - hi-kvadrat test

1. UVOD

Lišmenioze su skupina parazitarnih bolesti uzrokovanih protozoama roda *Leishmania* (Kinetoplastida: *Trypanostomatidae*). Prenose ih nevidi (papatači), sitni hematofagni člankonošci rodova *Phlebotomus* i *Lutzomya* (1, 2).

Lišmenije su bičashi koji tijekom životnog ciklusa pokazuju dimorfizam – u vektoru se nalaze u ekstracelularnom obliku promastigota, a u vertebratima se nalaze intracelularno kao amastigoti. Promastigoti su vitke vretenaste, pokretne forme dugačke 15-25 μm s izraženim bičem. Osim u vektoru promastigoti se mogu uzgojiti i na hranjivim podlogama. Amastigoti, poznati i kao Leishman-Donovannova tjelešca, znatno su manji (2-4 μm), okrugli i bez biča, a uvijek se nalaze u stanicama zaraženih vertebrata. U preparatima obojanim po Giemsa-Romanovskom unutar amastigota jasno se uočavaju jezgra i kinetoplast (1, 2, 3). Kinetoplast je specijalizirano mitohondrijsko tjelešce koje upravlja bičevima. Građeno je od više tisuća malenih kružnih DNK (engl. *minicircles kDNA*) i nekoliko desetaka većih kružnih DNK (engl. *maxicircles kDNA*) čvrsto isprepletenih u mrežu (4).

Za održavanje lišmenija u prirodi nužna je prisutnost kompetentnih vektora. Dokazani vektori za lišmenije su 30 vrsta nevida (5), iako su se kao mogući vektori spominjali i drugi člankonošci, krpelji primjerice (6). Nevidi su sitni (2-3 mm) dvokrilci blijedožučkaste boje. Jaja polažu na zemlju bogatu trulim organskim materijalom, primjerice u brlozima malih glodavaca, stajama, trulim deblima i sl. Slabi su letači pa se hrane u blizini legla, uglavnom noću (1). Rasprostranjeni su u područjima s toplom, suhom klimom. Za potpuni razvoj od jaja do odraslog insekta treba im 36 dana ili više ovisno o temperaturi okoliša (7). Promjene klime u umjerenom pojasu s produženim trajanjem visokih temperatura omogućavaju razvoj više generacija i gušće populacije, utječući time i na prisutnost bolesti koje ovi hematofagni insekti prenose (8). Kompetentnost vektora odraz je evolucijske prilagodbe lišmenija na nevide i obrnuto. Permisivnost nevida za lišmenije često je vrsno specifična, mada su opisane i za više

vrsta lišmenija permisivne vrste nevida; kao i hibridi dviju vrsta lišmenija (*L.infantum/L.major*) za koje je opisano uspješno umnožavanje u nevidima koji su permisivni za samo jednu vrstu lišmenija iz hibrida (9). Za uspješno odvijanje razvojnog ciklusa lišmenija, od amastigota usisanih tijekom krvnog obroka do infektivnih metacikličkih promastigota, obično je potrebno 6-9 dana (10). Paraziti su da bi preživjeli uvjete u probavnom sustavu nevida razvili brojne prilagodbene mehanizme kao što su stvaranje zaštitnih fosfoglikana, lučenje hitinaze koja razgrađuje valvulu na prelazu prednjeg u srednje crijevo nevida, lučenje neuropeptida koji zaustavlja peristaltiku crijeva, te vezanje na sluznicu kako bi izbjegli izbacivanje iz probavnog sustava (10, 11). Mada utjecaj lišmenija na duljinu života papatača nije poznat i ovaj se dio razvojnog ciklusa lišmenija može svrstati pod definiciju parazitizma (10).

Rod *Leishmania* zajedno s rodом *Trypanosoma* pripada porodici Trypanosomatidae, redu Trypanosomatida, razreda Kinetoplastea, carstva Protista (12) U rodu *Leishmania* opisano je tridesetak vrsta (2, 13). Klasifikacija lišmenija otežana je činjenicom da su različite vrste morfološki identične, te ih klasičnim parazitološkim metodama, mikroskopiranjem i kultivacijom, nije moguće razlikovati. Od prvog opisa roda *Leishmania* 1903. godine broj vrsta unutar roda se neprestano mijenjao (14). Lišmenije su razvrstavane isprva prvenstveno na temelju kliničkih, bioloških, zemljopisnih i epidemioloških podataka, a kasnije imunoloških i biokemijskih svojstava (14). Od 1990.-tih zlatni standard za identifikaciju i klasifikaciju lišmenija je metoda multilokusne enzimske elektroforeze (MLEE, engl. *multilocus enzyme electrophoresis*) uzgojenih sojeva kojom je definirano 17 vrsta (13, 15). Metoda se bazira na zimodemima, određenim kroz izoenzimski profil za 15 enzimatskih sustava analiziranih elektroforezom u škrobnom gelu (15, 16). S razvojem novijih, molekularnih, dijagnostičkih metoda kao što su polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (RFLP, engl. *restriction fragment length polymorphism*) unutrašnje prepisane razmaknice (engl. *internal transcribed spacer 1- ITS1*) i filogenetska analiza HSP 70 gena (engl. *heat-shock protein70 gen*) postalo je očito da će postojeća klasifikacija doživjeti bitne promjene (2, 13, 14, 17, 18, 19). Važeća klasifikacija unutar roda opisuje dva podroda, *Leishmania* i *Viania*, razdvojena na

temelju dijela probavnog sustava nevida u kojem se odvija replikacija lišmenija; u prednjem (Suprapylaria) ili zadnjem dijelu crijeva (Peripylaria) (13, 15).

U podrodu *Leishmania* nalaze se vrste povezane s visceralnom lišmeniozom (VL) koje pripadaju *L. donovani* kompleksu: *L. donovani*, *L. infantum* i *L. archibaldi*, slijede uzročnici kutane lišmenioze (CL) razvrstane u komplekse: *L. major*, *L. tropica* i *L. mexicana* (2, 14). U podrodu *Viannia* nalaze se južnoameričke vrste iz kompleksa *L. braziliensis* i *L. guyanensis* (2, 14). Primjer za taksonomske promjene i potaknute znanstvene debate je *L. chagasi* za koju je molekularnim metodama utvrđeno da su ranije opažene epidemiološke i kliničke sličnosti s *L. infantum* odraz identičnosti. Naime, danas se smatra da se radi o jednoj te istoj vrsti koju su španjolski osvajači „izvezli“ u Južnu Ameriku gdje se uspješno prilagodila lokalnim vektorima i uvjetima (20).

1. 1. Lišmenioze – klinička slika

Prema kliničkoj slici razlikujemo: visceralnu lišmeniozu (VL), kožnu (CL) i kožno-sluzničku lišmeniozu.

Viscerotropne su dvije vrste lišmenija: antropofilna *Leishmania donovani* i zoofilna *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) (1, 3, 21-23). Simptomi VL šire se u rasponu od asimptomatske i subkliničke infekcije do akutnih, subakutnih i kroničnih formi bolesti (3, 18, 24). Razvijena klinička slika VL može nastati naglo ili se razviti postupno, nakon inkubacije od par tjedana do nekoliko mjeseci. Bolest karakteriziraju produžena vrućica, progresivan gubitak težine, malaksalost i izražena hepatosplenomegalija.

Od laboratorijskih nalaza najčešće se pojavljuje hipergamaglobulinemija s hipoalbuminemijom, te pancitopenija (leukopenija, anemija i trombocitopenija) (24). Navedeno je posljedica umnožavanja lišmenija u mononuklearnim fagocitima, te hiperplazije stanica retikuloendotela (3). Ukoliko se ne liječi, bolest dovodi do smrti nakon nekoliko mjeseci (3).

Za liječenje VL primjenjuju se pentavalentni antimonovi spojevi: natrijev stiboglukonat i meglumin antimonijat, u preporučenim dozama od 20 mg Sb/kg/dan, im ili iv kroz 28 dana. U bogatijim zemljama lijek izbora je skupi liposomalni Amfotericin B. Prednosti ovog lijeka su veća učinkovitost, manja toksičnost te kratkotrajnost liječenja. Preporučene doze se kreću od 2-4 mg/kg/dan u 6-7 doza (3, 24).

U bolesnika zaraženih s *L. donovani* i dvije godine nakon izliječenja može se pojaviti postkalaazarna kožna lišmenioza (engl. *post kala-azar dermal leishmaniasis*, PKDL) (18). Na koži se javljaju hipopigmentirane makule, papule i noduli, te eritem lica (3, 18). Između VL koju uzrokuje *L. donovani* i one koju uzrokuje *L. infantum* postoje značajne kliničke i epidemiološke razlike te bi naziv kala-azar bilo uputno koristiti samo za VL uzrokovanu s *L. donovani*, a bolest koja se pojavljuje na Mediteranu nazivati sredoziemnom VL (25).

Poput visceralnih i kožne lišmenioze variraju u formi i težini bolesti (24). CL može ostati supklinička ili se nakon inkubacije od nekoliko tjedana pojavljuje lezija. Promjena na koži se razvija od papule, preko nodula do ulcerativne forme kojoj je središnji dio uvučen, a rub uzdignut. Nakon nekoliko mjeseci dolazi do spontanog ožiljkastog cijeljenja (1, 3, 24). CL se s obzirom na izgled i progresiju lezije može dalje podijeliti na suhe (*L. tropica*, *L. infantum*) i vlažne (*L. major*) forme bolesti. U nekih se bolesnika, osobito u Južnoj Americi, javljaju i sekundarne, satelitske lezije. Složenost različitih formi CL predstavlja veliki izazov za postavljanje ispravne dijagnoze (18).

Sluzničke lišmenioze zastrašujuće su posljedice kožne lišmenioze uzrokovane južnoameričkim lišmenijama podroda *Viannia* (24). Nastaju hematogenim ili limfogenim rasapom iz primarne kožne lezije u sluznicu nosa, usta, farinksa ili larinksa. Mogu nastati uz još prisutnu kožnu promjenu mada se češće javljaju godinama čak i desetljećima nakon zacijeljenja primarne lezije. Dovode do razaranja zahvaćenog tkiva i posljedičnog unakazivanja (1, 3, 24).

Nastanak pojedine kliničke slike posljedica je interakcije brojnih čimbenika kako od strane uzročnika i domaćina, tako i od strane vektora (26). Pojedine vrste lišmenija vezuju se uz određene kliničke slike, te se i važeća klasifikacija lišmenija temelji na viscerotropnosti ili dermatotropnosti pojedine vrste. Od strane domaćina neki su faktori rizika davno prepoznati i dobro opisani, tako su primjerice muški spol, dječja dob, te malnutricija poznati čimbenici rizika za nastanak *L. infantum* VL (2, 3, 12, 27).

Širenje virusa humane imunodeficijencije (HIV) ukazalo je na latentnu prisutnost ove zanemarene parazitoze i bilo je odgovorno za porast VL među odraslim osobama (13). Lišmenioze se sve češće opisuju i u primatelja solidnih organa koji žive u endemskim krajevima i to najčešće visceralne, zatim kožnosluzničke te najrjeđe kožne forme bolesti (28). Svi čimbenici koji umanjuju staničnu imunost, kao što maligne bolesti, kemoterapija, zračenje, primjena kortikosteroida i anti-TNF (engl. *tumor necrosis factor*) terapija, pridonose nastanku VL (29, 30).

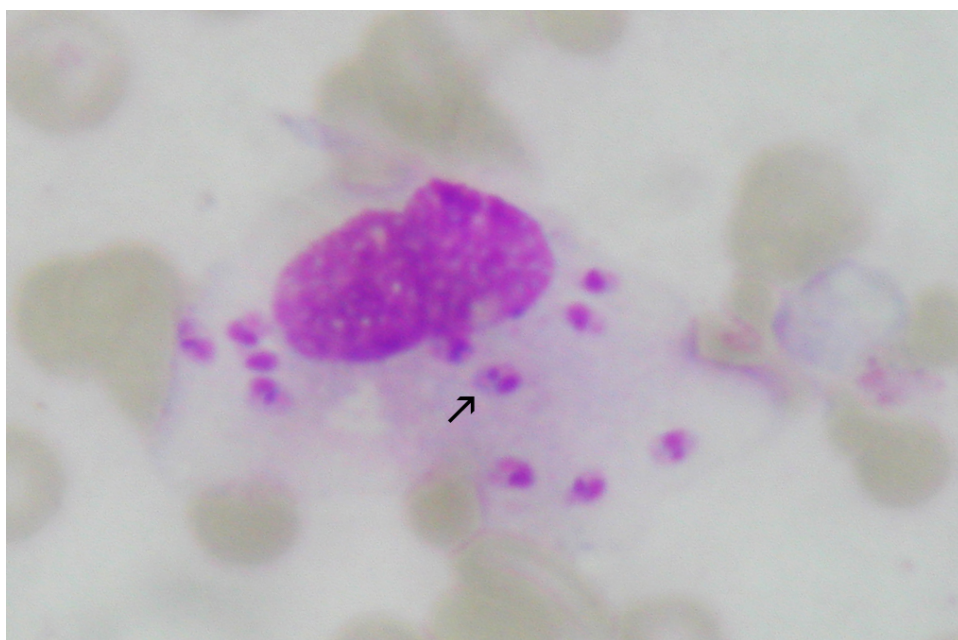
Osim tipičnih opisane su i brojne atipične forme bolesti osobito u bolesnika čiji je imunološki sustav oslabljen nekom osnovnom bolešću, infekcijom ili lijekovima.

Primjena kortikosteroida i drugih imunomodulatornih lijekova s jedne strane povećava rizik od nastanka infekcije, a s druge rezultira neuobičajenim manifestacijama bolesti koje otežavaju i odgađaju postavljanje dijagnoze (31). Primjerice, vrste koje su inače viscerotropne uzrokuju sluzničke forme bolesti (28, 31). Navedene skupine bolesnika oslabljene imunosti ukazale su na latentnu prisutnost lišmenija i visoki udio asimptomatskih infekcija.

1. 2. Dijagnostika lišmenioza

Klinička sumnja na lišmeniozu može se potvrditi izravnim parazitološkim i neizravnim serološkim testovima (25, 32-34).

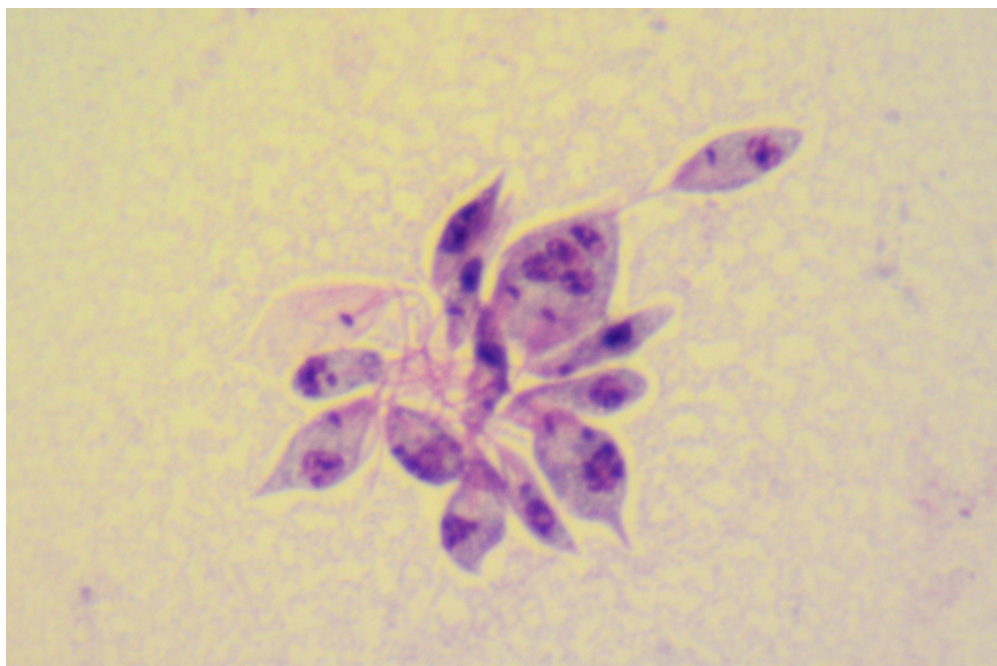
Izravna, parazitološka dijagnostika uključuje: mikroskopski nalaz amastigota i izolaciju uzročnika na hranjivim podlogama, te u novije vrijeme dokaz i identifikaciju molekularnim testovima. Uzorci za parazitološku dijagnostiku VL su: punktati koštane srži, te rjeđe puna krv, bioptati limfnih čvorova, slezene i jetre; a za CL se uzorkuju punktati, bioptati i strugotine ruba lezije. Razmasci se nakon fiksiranja metilnim alkoholom najčešće bojaju po Giemsa-Romanowskom. Parazitski se oblici, amastigoti, nalaze intracelularno u makrofagima, citoplazma im se boja nježno plavo, a jezgra tamno crveno. Uz jezgru se karakteristično vidi jednako obojeni štapićasti kinetoplast (Slika 1.)



Slika 1. Izravni mikroskopski preparat bioptata ruba kožne lezije, uzorak CL-2009 (bojenje Giemsa-Romanowski, povećanje 1000 x). Karakteristični amastigotni oblici (strelica) nalaze se unutar makrofaga.

Ošjetljivost mikroskopije bioptata koštane srži VL bolesnika je 60-85%, a bolji se rezultati postižu pregledom punktata slezene (95%) no ti su uzorci znatno invazivniji i postupak uzorkovanja je povezan s mogućnošću fatalnih krvarenja osobito u trombocitopeničnih bolesnika (35).

Lišmenije se mogu uzgajati na različitim bogatim hranjivim podlogama, kao što su dvofazne podloge na bazi krvnog agara: NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) podloga i Evansova modifikacija podloge po Tobieu; te različitim monofaznim tekućim podlogama kao što je Schneiderova *Drosophila* podloga (2, 27, 36, 37). Osjetljivost izolacije na hranjivim podlogama se kreće do 70% (38). Uzorci za kultivaciju trebaju biti brzo dostavljeni u laboratorij gdje se nasijavaju u tekuću fazu dvofaznih podloga te se kultiviraju pri temperaturu od 21–23°C kroz tri tjedna. Kulture se pregledavaju na promastigote (Slika 2.) svaka dva do tri dana, a kad se jednom uoči porast prebacuju se na svježije podloge ili krioprezerviraju (39).



Slika 2. Promastigoti iz kulture (bojenje Giemsa-Romanowski, povećanje 1000x).

Kultivirane lišmenije se mogu dalje identificirati i tipizirati u referentnim laboratorijima. Mada se jednom izolirana kultura promastigota relativno uspješno može održavati na podlogama, primarna izolacija iz kliničkih uzoraka je izazovna (36). Nadalje, kultivacija je dugotrajna, kulture se lako kontaminiraju, laboratorij treba biti opremljen posebnim

hlađenim inkubatorima koji održavaju temperaturu oko 25°C, te treba održavati laboratorijski soj koji se obavezno nasijava paralelno s uzorkom radi kontrole kvalitete podloge. Sve navedeno čini kultivaciju lišmenija vrlo složenom i skupom (35).

Neizravna serološka dijagnostika dokazuje protutijela na lišmenije. Na tržištu je dostupno nekoliko dobro standardiziranih seroloških testova: enzimski imuno test (ELISA; engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), test neizravne imunofluorescencije (IFA; engl. *indirect immunofluorescence assay*) i test neizravne hemaglutinacije (IHA; engl. *indirect haemagglutination*) (32, 40), od kojih najvišu osjetljivost i dijagnostički značaj ima IFA (41). U nekim referentnim laboratorijima dostupan je i najosjetljiviji western blot test (42-44). Za potrebe terenskog testiranja u siromašnim zemljama razvijeni su izravni aglutinacijski test (DAT; engl. *direct agglutination*) te imunokromatografski test za rK39 antigen (45).

Serološki testovi su od osobite koristi u dijagnozi prve epizode VL. Naime čak i kada su parazitološki testovi negativni (mikroskopski pregled i kultivacija) pozitivan nalaz IFA testa u osoba s jasnim kliničkim znakovima VL čini dijagnozu vrlo vjerojatnom (34). Nadalje serološka testiranja od koristi su u epidemiološkim studijama procjene prevalencije asimptomatskih oblika bolesti (46-50).

S druge strane serološki testovi gube na vrijednosti kada se razmatraju eventualni recidivi bolesti ili terapijski neuspjesi, naime, u serumima ljudi koji su preboljeli VL i nakon uspješnog izliječenja mogu ostati detektabilna protutijela na lišmenije bez povezanosti s lošim prognostičkim ili terapeutskim odgovorom (40). Nadalje u CL bolesnika serološki testovi nisu od koristi jer su im anti-*Leishmania* protutijela nedetektabilna ili u vrlo niskim titrovima (24, 51).

Zbog svega navedenog, kao nadopuna i zamjena klasičnoj parazitologiji, od ranih 1980-tih se počinju testirati različite molekularne metode. Isprva su to bili DNK hibridizacijski postupci, koje su uskoro potisnuli PCR postupci (35). Da bi se postigla viša osjetljivost za ciljna mjesta amplifikacije izabrane su sekvencije koje se u stanici nalaze u

višestrukim kopijama. Tako su kreirane početnice za umnožavanje: konzerviranih sekvencija u minikružnicama DNK kinetoplasta (kDNA) kojih ima oko 10^4 po stanici (35, 52) ili za gene male podjedinice ribosomalne RNK (SSU-rRNA; engl. *small subunit ribosomal RNA*) koji su umnoženi u *Leishmania* genomu više od 100 puta (38, 53).

Neki od PCR postupaka omogućavaju i identifikaciju vrste lišmenija na temelju analize produkata enzimske razgradnje umnožene sekvencije kao što je ITS1 (54, 55) i HSP70 (gen za heat-shock protein 70) (25, 32, 34, 54). Potonji se pokazao pogodnim za analizu sekvencioniranjem čiji rezultati su usporedivi s MLEE tipizacijom (19). Molekularne metode korisne su i za tipizaciju sojeva u epidemiološke svrhe, mada ih treba koristiti s oprezom i u suradnji s referentnim laboratorijima (15, 56).

Dodatna prednost PCR postupaka je širina spektra uzoraka u kojima je moguće dokazati i identificirati DNK lišmenija, od svježih uzoraka pune krvi, različitih uzoraka pohranjenih i transportiranih na filter papiru do mikroskopskih preparata starih i više desetljeća (25, 57-60). Molekularnim su metodama dokazane lišmenije i u uhvaćenim ženjkama nevida (61). Visoka osjetljivost molekularnih metoda omogućila je i izravnu detekciju asimptomatskih parazitonoša (52). Zbog svega navedenog treba imati na umu da rezultate molekularnih pretraga uvijek treba interpretirati u skladu s kliničkom slikom i drugim nalazima.

1.3. Lišmenioze – epidemiologija

Lišmenioze su endemske infekcije u 101 zemlji tropskog, suptropskog i umjerenog pojasa na svim kontinentima osim Australije i Antarktike (39, 62). Najčešće zahvaćaju najsiromašnju populaciju i to većinom u zemljama u razvoju. Procijenjeno je da pod rizikom od lišmenioze živi 350 milijuna ljudi; godišnje se pojavljuje oko 2 milijuna novih slučajeva bolesti, od čega 0,5 milijuna VL i 1,5 milijuna CL (22, 39). Indija, Bangladeš, Sudan, Južni Sudan, Etiopija i Brazil - zemlje su u kojima se zabilježi najviše slučajeva visceralne forme bolesti, dok su kožne forme proširene od Latinske Amerike preko

Mediterana, Srednjeg Istoka do središnjih dijelova Azije (63). Iznimno je teško procijeniti stvarnu incidenciju i prevalenciju lišmenoza zbog niza faktora: brojni slučajevi bolesti bivaju neprepoznati ili pogrešno dijagnosticirani; u endemskim krajevima je bolest često neravnomjerno raspoređena s odvojenim raspršenim žarištima visoke učestalosti. Nadalje, samo je u manjem broju endemskih zemalja (n=33) prijavljivanje bolesti zakonski regulirano i obvezno. Stoga je za pretpostaviti da je broj slučajeva bolesti znatno veći od broja službeno prijavljenih, a ukupan broj infekcija još veći (5).

Lišmenioza je jedina tropska parazitoza, koju prenose člankonošci, a koja je endemski prisutna na jugu Europe. Incidencija VL u Europi je niska (0,02/100.000 do 0,49/100.000 godišnje) (21, 23). U sjevernim neendemskim zemljama Europe lišmenioza se javlja u osoba koje su putovale u endemske zemlje iz raznih razloga (turisti, vojnici i sl.) (64-67).

Na području Sredozemlja su prisutne tri vrste lišmenija: *L. infantum* (zoonotska VL i CL), *L. tropica* (antroponotska i zoonotska CL) i *L. major* (zoonotska CL) (15). Međutim, nedavna identifikacija *L. donovani* kao uzročnika VL i CL na Cipru ukazuje na mogućnost promjena u zemljopisnoj distribuciji lišmenija (68). Ista uobičajeno viscerotropna vrsta *L. donovani* identificirana je kao uzročnik CL u Šri-Lanki i Sudanu (69, 70).

U Europi je najraširenija vrsta *L. infantum*, koja je značajan parazit pasa i stoga predstavlja veliki problem u veterinarskoj medicini (21, 23, 71). Seroprevalencija na lišmenije raste s dobi, tjelesnom težinom pasa te boravkom na otvorenom (8). Bolest je potvrđena i u drugih životinja; u mačaka koje mogu poslužiti kao sekundarni rezervoar infekcije, te konja u kojih bolest prolazi spontano (22). Nedavno opisana epidemija lišmenioze na širem Madridskom području, s 542 slučaja oboljelih od srpnja 2009. do kraja 2010. otkrila je da i druge vrste sisavaca, u ovom slučaju zečevi mogu poslužiti kao rezervoari za lišmeniju (72). Čovjek je razmjerno slabo prijemčiv za *L. infantum* te su asimptomatske infekcije češće od manifestnih (73). Koinfekcija s HIV-om otkrila je oportunistički karakter ove vrste lišmenije, klinički manifestni slučajevi tek su „vrh sante leda“. Procijenjeno je da na jednog oboljelog ide 30 - 100 asimptomatskih infekcija (21).

Koinfekcija HIV/VL proširila se po mediteranskim zemljama Europe od sredine 80-tih da bi dosegla svoj vrhunac između 1996. i 1998. godine, kada je uvedena visoko učinkovita antiretrovirusna terapija (HAART; engl. *highly active antiretroviral therapy*), nakon toga je došlo do značajnog pada HIV/VL incidencije (13, 74).

Za procjenu proširenosti bolesti i izloženosti stanovništva juga Europe rađene su seroepidemiološke studije koje su dokazale protutijela u 0,5% do 38% zdravih osoba bez simptoma infekcije (43, 46, 48, 49).

Zadnjih je desetljeća opisano širenje bolesti i pojava autohtonih slučajeva u neendemskim krajevima kao što je sjeverni dio Italije i Njemačka (21, 73, 75). Ovaj trend potvrđuju i studije bioklimatskih promjena koje ukazuju na moguće puteve širenja kompetentnih vektora a posljedično i bolesti sjevernije u središnje dijelove Europe (76). Klimatske promjene osim širenja vektora u sjevernije krajeve dovode i do produljenja razdoblja aktivnosti nevida u poznatim endemskim krajevima gdje raste rizik za lokalno stanovništvo i životinje (8).

Na opažene promjene u epidemiologiji lišmenioza osim navedenih klimatskih utječu i drugi razlozi: čovjekov utjecaj na okoliš, porast broja osoba smanjene imunosti, putovanja u egzotične krajeve, te uvoz egzotičnih kućnih ljubimaca (15, 21, 23). Utjecaj čovjeka na okoliš može rezultirati epidemijama kakva se razvila u Španjolskoj zahvaljujući promjeni životnog okoliša za zečeve (*Lepus granatensis*) koji su postali rezervoar i izvor bolesti za ljude (77). Epidemiološke promjene te pojava rezistencije uzročnika na lijekove prvog izbora, uz nekontroliranu primjena lijekova u veterini iziskuju stalan, koordiniran, multidisciplinarni nadzor nad ovom podcijenjenom parazitozom (15, 21, 23).

1. 4. Lišmenioze u Hrvatskoj

U Hrvatskoj su lišmenioze prepoznate 30-tih godina prošlog stoljeća. Prvi slučaj VL, u bolesnice iz Dubrovnika, opisali su Radoničić, Lušicki i Prašek 1930. u Zagrebu. Posljedično Krmpotić opisuje postojanje endemskog žarišta na dubrovačkom području (78). Od 1931. bolest je dijagnosticirana u više bolesnika iz okolice Splita i makarskog

primorja, otkrivajući endemsku prisutnost lišmenioze u Dalmaciji (27, 79, 80). Na temelju opaženog kala-azar je uvršten među bolesti koje podliježu obveznom prijavljivanju. Od 1945. opaženi su i prvi slučajevi CL na području Dalmacije (27). Do 1957. utvrđeno je 398 oboljelih od VL, od kojih su 220 bili muškarci, a 178 žene; te 201 slučaj CL, od kojih 67 kod muškaraca i 134 kod žena (27). Najveći broj VL bolesnika bio je među djecom, 90,45% svih oboljelih bilo je mlađe od 10 godina, a 57,03% oboljenja je utvrđeno među djecom mlađom od 3 godine (27). Za razliku od toga CL se češće pojavljivala u odraslih (27).

Primjenom insekticida, u sklopu eradikacije malarije 50-tih godina XX. stoljeća, učestalost lišmenioze u Hrvatskoj se svela na malobrojne sporadične slučajeve (81). Tako da su u razdoblju od 1975. do 1991. godine zabilježena samo tri bolesnika s VL (33, 82). Nekoliko je slučajeva VL opisano u djece i odraslih turista koji su ljetovali na hrvatskoj obali, a bolest se manifestirala po povratku u zemlju boravka (83-85).

Tijekom i nakon Domovinskog rata u Hrvatskoj je opažen značajni porast broja bolesnika s VL (33, 82). Kao mogući razlozi porasta navode se: pad standarda i kvalitete prehrane te posljedično pad imunosti, kao i prekid sustavne primjene insekticida (33, 82). Bolest se i dalje opisuje češće u djece mlađe od 10 godina i osoba muškog spola (33, 82). Nadalje uz tipične kliničke slike opisane su i one s neobičnim kliničkim tijekom kao što je dermatomyositis (44, 86), te bolest ograničena na limfni čvor (87).

Istodobno je zabilježen i značajan porast učestalosti lišmenioze u pasa (CanL) Pregledom bolesnih životinja izolirana je i identificirana vrsta *L. infantum* (88). Zbog toga je Ministarstvo poljoprivrede u periodu od 2002. do 2005. uvelo obvezno besplatno testiranje simptomatskih pasa i liječenje alopurinolom za potvrđene CanL slučajeve u endemskim županijama: Šibensko-kninskoj, Splitsko-dalmatinskoj i Dubrovačko-neretvanskoj županiji. Navedene mjere povećale su svijest o bolesti i dostupnim dijagnostičkim, terapijskim i preventivnim mjerama u vlasnika životinja. Učestali su zahtjevi za besplatnim testiranjem i naizgled zdravih životinja, te se povećala primjena repelenata koji štite od ugriza nevida. Nažalost zbog manjka sredstava mjera je ukinuta 2006. godine (89). U studiji provedenoj 2003. godine na širem splitskom području, dot

ELISA testom u serumima naizgled zdravih pasa utvrđena su protutijela na lišmenije do 42,85 % (71).

Prisutnost vektora u Dalmaciji potvrđena je višekratnim entomološkim studijama. Tartaglia je opisao prisutnost *Phlebotomus major*, *P. perniciosus* i *P. perfiliewi* (79). U istraživanju koje su proveli Mišević i sur. na Mljetu (1985. - 1990.) uz *Phlebotomus tobbi*, *P. neglectus* i *P. perfiliewi* jedini je put opisan i *Ph. perniciosus* (90). Posljednja trogodišnja (2002. – 2004.) studija provedena na 10 različitih lokaliteta od Slivna na sjeveru do Uskoplja na jugu potvrdila je polugodišnju aktivnost tri za lišmenije kompetentna vektora: *Phlebotomus tobbi*, *P. neglectus* i *P. perfiliewi* (91). Entomološki podatci za ostale dijelove Hrvatske nisu poznati, no u južnim dijelovima Mađarske blizu hrvatske granice, opisana je prisutnost kompetentnih vektora *P. neglectus* i *P. perfiliewi* (92, 93).

Lišmenioze, kožni i visceralni oblici, nalaze se na „Listi bolesti čije je sprečavanje i suzbijanje od interesa za Republiku Hrvatsku“, članak 3. stavka 1. „Zakona o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti“ (NN br. 79/07, 113/08 i 43/09). Nalaze se u skupini bolesti koje su određene Zakonom o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti, a nisu među bolestima koje je odredila Europska unija, te podliježu obaveznom prijavljivanju.

U razdoblju od 1999. do 2010. ukupno je bilo prijavljeno 26 oboljelih od VL, većinom stanovnika dalmatinske obale južno od Zadra (94, 82). Opisan je prvi slučaj VL u osobe izvan endemskog područja koja je bolest najvjerojatnije stekla tijekom boravka na Velebitu, što ukazuje na moguće širenje bolesti na sjever.

Klinički suspekti slučajevi VL u ljudi potvrđeni su mikroskopskim nalazom amastigota u razmazima punktata koštane srži te serološkim testovima, najčešće IFA testom (33, 82). Tim metodama nije moguće identificirati uzročnu vrstu lišmenije.

Prema podacima iz susjednih zemalja za pretpostaviti je da je *L. infantum* vrsta uzročnik kako VL tako i CL, mada je moguća i prisutnost *L. tropica*.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Molekularnom metodom u biološkim uzorcima bolesnika utvrditi vrstu koja uzrokuje:
 - a. visceralnu lišmeniozu (VL) u ljudi
 - b. kožnu lišmeniozu (CL) u ljudi.
2. Serološkim testiranjem (ELISA) ustanoviti prevalenciju za lišmeniju specifičnih protutijela u stanovnika iz ekološki različitih dijelova Hrvatske (kontinentalne Hrvatske, primorske Hrvatske – Sjeverni Jadran, primorske Hrvatske – Dalmacija). Očekivana je prisutnost protutijela u dijelu populacije u endemskim krajevima i odsutnost protutijela u serumima ljudi iz neendemskih krajeva Hrvatske.
3. Evaluirati učinkovitost različitih izravnih (PCR, mikroskopija punktata) i neizravnih (ELISA, IFA i IHA) parazitoloških postupaka u dijagnostici lišmenioze te predložiti dijagnostički postupnik za rad vodeći računa o lokalnim kapacitetima (financije, ljudi, oprema).
4. Uz otkrivanje klinički jasnog bolesnika, otkriti i među članovima obitelji one s asimptomatskom infekcijom. Praćenjem starih i novootkrivenih slučajeva bolesti prikupljeni su epidemiološki i drugi podatci o bolesnicima te prikupljeni uzorci seruma ostalih članova obitelji i testirani su s tri različita serološka testa.

Studija je imala tri primarna ishoda:

1. molekularnim metodama identificirati vrstu lišmenije koja cirkulira i uzrokuje infekcije u endemskim dijelovima Hrvatske
2. utvrditi valjanost dijagnostičkog PCR testa određenu parametrima osjetljivosti, specifičnosti, te pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti, pri čemu je standard istine serološki test
3. utvrditi razlike u seroprevalenciji za lišmeniozu između različitih ekoloških regija Hrvatske i saznati područja endemskih žarišta.

Uz navedeno uspoređena je osjetljivost triju različitih seroloških metoda (ELISA, IFA i IHA) za dijagnostiku infekcije.

Također analizirane su kliničke značajke bolesnika liječenih od lišmenioze u zadnjih 20 godina u KBC Split, jer je poznato da se VL može pojavljivati s različitim neuobičajenim manifestacijama.

3. MATERIJALI I METODE

Ovo je primjenjeno istraživanje, koje je dijelom:

- i. retrospektivno:
 - a. prikupljanje i molekularno pretraživanje arhiviranih mikroskopskih preparata bolesnika liječenih od lišmenioze u periodu od 1998. – 2006. godine
 - b. pretraživanje medicinske dokumentacije osoba liječenih od visceralne lišmenioze u KBC Split.
- ii. presječno:
 - a. utvrđivanje prisutnosti protutijela u serumima zdravih stanovnika iz različitih područja priobalne i kontinentalne Hrvatske.
- iii. prospektivno:
 - a. od 2007. godine dijagnosticiranje novooboljelih osoba s lišmeniozom
 - b. prikupljanje demografskih, kliničkih i epidemioloških podataka o novootkrivenim bolesnicima te testiranje seruma obiteljskih kontakata s tri različita serološka testa.

Istraživanje je imalo dva metodološka pristupa dijagnostici lišmenioza:

- Izravna parazitološka dijagnostika: molekularna detekcija i identifikacija lišmenija u arhiviranim ili svježim mikroskopskim preparatima kliničkih uzoraka.
- Serološka dijagnostika: u serumima bolesnika i zdravih osoba dokazivat će se prisutnost protutijela, nastalih kao odgovor na infekciju s lišmenijom.

3. 1. Molekularna detekcija i identifikacija lišmenija u arhiviranim mikroskopskim preparatima različitih kliničkih uzoraka

3. 1. 1. Prikupljanje uzoraka za molekularnu dijagnostiku

Za detekciju i identifikaciju lišmenija prikupljeni su arhivirani, mikroskopski preparati različitih kliničkih uzoraka uzorkovani oboljelima od lišmenioze. Ukupno su

prikupljena 52 uzoraka (punktata koštane srži, bioptata kože i limfnih čvorova) koji su testirani u Istituto Superiore di Sanità, u Rimu u Italiji.

Visceralna lišmenioza - prikupljanje uzoraka

Visceralna lišmenioza potvrđuje se nalazom amastigota u mikroskopskim preparatima punktata koštane srži, te dokazom protutijela na lišmenije u uzorcima seruma bolesnika. Serološke pretrage se obavljaju u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split dok je uobičajena je praksa da se mikroskopske pretrage punktata koštane srži obavljaju u Citološkom laboratoriju Kliničkog zavoda za patologiju KBC Split. Najčešće se u laboratorij pošalju višestruki preparati koji se onda bojaju po Giemsi ili drugim metodama, mikroskopiraju, te se izdaje nalaz. Preparati, obojeni i neobojeni, pohranjuju se potom u arhivi Odjela za citologiju. Budući da se suspektni VL slučajevi upućuju u laboratorij pod raznim uputnim dijagnozama, od febrilnog stanja do pancitopenije, kao kriterij za izdvajanje uzoraka bolesnika kod kojih se sumnjalo na lišmeniozu uzet je paralelno obavljen pregled seruma istih bolesnika na protutijela na lišmenije. Pregledan je protokol Laboratorija za serologiju Kliničkog zavoda za mikrobiologiju te su prikupljeni podaci o svim bolesnicima koji su bili pozitivni od uvođenja pretrage u KBC 1993. g. Dobiveni popis s imenima i datumom izvršenih IFA testova korišten je za pretraživanje protokola i archive Odjela za citologiju. Za kontrolnu skupinu, istim postupkom, prikupljeni su mikroskopski preparati punktata osoba u čijim serumima nisu nađena protutijela na lišmenije.

Na taj je način prikupljeno 47 uzoraka koštane srži od čega:

- 23 bolesnika s dokazanom visceralnom lišmeniozom (VL)
- 4 dodatna uzorka dvojice bolesnika koji su imali recid VL (RVL)
- 20 ispitanika kod kojih se sumnjalo na visceralnu lišmeniozu (SVL).

Kožna lišmenioza - prikupljanje uzoraka

Iz arhiva navedenih laboratorija prikupljeni su i preparati 4 uzorka bioptata kože, od čega tri bolesnika s dokazanom kožnom lišmeniozom (CL) i jednog kod kojeg je mikroskopski nalaz bio negativan te jedan uzorak bioptata limfnog čvora bolesnice kojoj je mikroskopski bila dokazana lokalizirana lišmenioza (LČ).

Prikupljeni uzorci bili su arhivirani u papirnatim omotnicama pri sobnoj temperaturi u razdoblju od 1999. – 2010. g. Budući da su neke studije (95, 96) pokazale da bojenje može utjecati na rezultate molekularnih testova, kada je bilo moguće prikupljeni su neobojeni razmazi. Uzorci nisu posebno iznova mikroskopirani u ovom istraživanju nego su korišteni protokolirani podatci o izdanim nalazima ranije napravljenog pregleda. Na taj način smo željeli simulirati situaciju u kojoj jedan dio nekog uzorka biva upućen u citološki, a drugi u molekularni laboratorij.

Podatci o bolesnicima prikupljeni su pregledom povijesti bolesti u arhivi Odjela za zarazne bolesti KBC Split.

3. 1. 2. Izolacija DNK iz bioloških materijala

Obojanim preparatima prvo se uklonila boja ispiranjem u apsolutnom etanolu, pa destiliranoj vodi, potom su podvrgnuti daljnjem postupku kao i neobojeni uzorci.

Osušeni biološki materijal s predmetnih stakala otopljen je i ispiran s 200 µl TE pufera (Invitrogen) u označene epruvetice. Otopljeni materijal je centrifugiran (5000 RPM /10 min) i dobiveni sediment resuspendiran u 90 µl pufera za lizu (50mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 2,5 mM MgCl₂; 0,5% Tween 20). Dodano je 10 µl proteinaze K (2 mg/ml radne otopine) i sve zajedno inkubirano u vodenoj kupelji (60°C/2h), pa u termobloku (95°C/10 minuta). Nakon centrifugiranja (13000 RPM/15 min) dobiveni supernatant u kojem je ekstrahirana DNK pohranjen je na -20°C ili upućen u PCR protokol.

3. 1. 3. Dijagnostički SSU-PCR protokol

Za otkrivanje DNK lišmenija u uzorcima korišten je PCR protokol za malu podjedinicu ribosomalne RNK (SSU-PCR) protokol (54). To je ugniježđena lančana reakcija polimerazom (nested PCR) koja se izvodi u dva ciklusa sa četiri različite vrste početnica:

Za prvi krug koriste se početnice:

R221: 5' – GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG – 3'),

R332: 5' – GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG – 3');

a za drugi krug početnice:

R 223 (R 3: 5' – TCC CAT CGT AAC CTC GGT T – 3'),

R 333 (R 4: 5' – AAA GCG GGC GCG GTG CTG – 3').

Prvim se ciklusom reakcije umnožava polimorfna regija male podjedinice ribosomalne RNK (engl. *small subunit* SSU rRNA ili 16 S) koji je zajednički bičšašima, a drugim ciklusom umnožava se za lišmenije specifični dio te regije.

Ovim PCR protokolom nije moguća identifikacija vrste, ali je vrlo visoke osjetljivosti i specifičnosti za dijagnostiku lišmenioza (54).

Za prvi krug pripremi se bazična mješavina (engl. *master mix* MM) prema recepturi datoj u tablici 1.

Tablica 1. Sastav bazične mješavine za prvi ciklus SSU-PCR protokola

Bazična mješavina (MM)			
No	Reagens	μl	Konačna koncentracija
1.	10 x PCR pufer	5	1 x
2.	MgCl ₂ (50 mM)	2,5	2,5 mM
3.	dNTP (10 mM)	1,25	250 μ
4.	R221 početnice (10 pmol/ μl)	1	15 pmol
5.	R332 početnice (10 pmol/ μl)	1	15 pmol
6.	Taq polimeraza	0,2	1 jedinica
7.	H ₂ O	29	
	Ukupni volumen MM	40	

Reakcija se izvodi u volumenima od 50 μl: od čega je 40 μl bazične mješavine (MM), a 10 μl izolirane DNK uzorka. Kao negativna kontrola koristi se voda, a kao pozitivna izolirana DNK kontrolnog laboratorijskog soja *Leishmania infantum*.

U uređaj za PCR se unese program za reakcijske parametre opisan u tablici 2.

Tablica 2. Reakcijski parametri za prvi ciklus SSU-PCR protokola

Broj ciklusa	Razdvajanje (engl. <i>denaturation</i>)	Sparivanje (engl. <i>annealing</i>)	Produljivanje (engl. <i>extension</i>)
Početni ciklus 2	5 minuta / 94°C	0	0
30 ciklusa	30 sekunda / 94°C	30 sekunda / 60°C	30 sekunda / 72°C
Završni ciklus	0	0	5 minuta / 72°C

Očekivana veličina prvog PCR produkta je 603 bp.

U idućoj reakciji koristi se MM pripremljena prema recepturi navedenoj u tablici 3.

Tablica 3. Sastav bazične mješavine za drugi ciklus SSU-PCR protokola

MM (engl. <i>master mix</i>)			
No	Reagens	μl	Konačna koncentracija
1.	10 x PCR pufer	2,5	1 x
2.	MgCl ₂ (50 mM)	0,25	0,5 mM
3.	dNTP (10 mM)	0,5	200 μM
4.	R223 početnice (10 pmol/ μl)	0,75	7,5 pmol
5.	R333 početnice (10 pmol/ μl)	0,4	4 pmol
6.	Taq polimeraza	0,2	1 jedinica
7.	H ₂ O	10,4	
	Ukupni volumen MM	15	

Reakcija se izvodi u volumenima od 50 μl: od čega je 47 μl MM, a 3 μl produkta prvog PCR ciklusa.

Tablica 4. Reakcijski parametri za drugi ciklus SSU-PCR protokola

Broj ciklusa	Razdvajanje	Sparivanje	Produljivanje
Početni ciklus	5 minuta / 94°C	0	0
30 ciklusa	30 sekunda / 94°C	30 sekunda / 65°C	30 sekunda / 72°C
Završni ciklus	0	0	5 minuta / 72°C

Očekivana veličina konačnog PCR produkta je 353 bp.

3. 1. 4. Identifikacijski ITS1-PCR protokol

Unutrašnja prepisana razmaknica (engl. *Internal transcribed spacer 1* - ITS1) područje je koje razdvaja ssu rRNK i 5.8S rRNK gene u ribosomalnom operonu različitih vrsta lišmenija.

Stoga je za identifikaciju vrste lišmenije korišten ITS1-PCR protokol (54) kojeg je slijedila analiza raznolikosti duljina produkata restrikcije (engl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP).

Za reakciju se koriste početnice:

LITSR: 5' – TGATACCACTTATCGCACTT – 3'),

L5.8S: 5' – CTGGATCATTTTCCGATG – 3');

Reakcija se izvodi kao ugniježđena lančana reakcija polimerazom u dva kruga kojim se umnožava ista regija. Reakcija se izvodi u volumenima od 50 µl: od čega je 47 µl bazične mješavine (Tablica 5), a 3 µl izolirane DNK uzorka.

Tablica 5. Sastav bazične mješavine za ITS1-PCR protokol

No	Reagens	Količina (μl)	Konačna koncentracija
1.	10 x PCR pufer	5	1 x
2.	dNTP (10 mM)	1	200 μM
3.	LITSR početnice (10 pmol/ μl)	2,5	25 pmol
4.	L.5.8 S početnice (10 pmol/ μl)	2,5	25 pmol
5.	DMSO	1,25	2,5 %
6.	Taq polimeraza (5 jedinica/ μl)	0,2	1 jedinica
7.	H ₂ O	34,55	
	Ukupni volumen MM	47	

Kao negativna kontrola koristi se voda, a kao pozitivna izolirana DNK kontrolnog laboratorijskog soja *Leishmania infantum*.

Tablica 6. Reakcijski parametri za ITS1-PCR protokol

Broj ciklusa	Razdvajanje	Sparivanje	Produljivanje
Početni ciklus	2 minute / 95°C	0	0
32 ciklusa	20 sekunda / 95°C	30 sekunda / 53°C	1 minuta / 72°C
Završni ciklus	0	0	6 minuta / 72°C

U drugi ciklus PCR reakcije ide 3 μl PCR produkta prve reakcije i 47 μl iste bazične mješavine (Tablica 5.) uz iste uvjete PCR reakcije (Tablica 6.).

Očekivana veličina PCR produkta je 300 do 350 bp ovisno o vrsti lišmenije.

3. 1. 5. Analiza raznolikosti duljina restrikcijskih fragmenata (PCR-RFLP)

Dobiveni produkti ITS1-PCR protokola podvrgavaju se razgradnji *Hae* III (Promega) endonukleazom prema uputama proizvođača.

Restrikcijski fragmenti se elektroforetski razdvajaju u 2% agaroznom gelu pri 100 V kroz 2 sata u 0,5 X TBE puferu. Različite vrste lišmenija imaju različite RFLP profile (Tablica 7).

Nakon 15 min bojanja etidium bromidom (0,5 µg/ml) gel se vizualizira pod UV svjetlom.

Tablica 7. Veličina fragmenta (bp) koji se dobiju cijepanjem s *Hae* III endonukleazom za pojedine vrste lišmenija.

<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L.aethiopica</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. major</i>
164	184	184	200	185	203
75	72	72	57	57	132
54	55	55	54	53	
			23	24	

Tablica priređena prema Schonian G *i sur.* (54).

3. 2. Serološka dijagnostika: pretraga uzoraka seruma na prisutnost protutijela nastalih kao odgovor na infekciju s lišmenijom

3. 2. 1. Serološka dijagnostika - uzorci

Serumi za serološka ispitivanja dobivaju se vađenjem 5 ml venske krvi u epruvetu bez antikoagulansa, ostavljanjem krvi da se zgruša, potom centrifugiranjem i odvajanjem tekuće faze koja se pohranjuje na -20°C do testiranja.

3. 2. 1. 1. Uzorci za seroepidemiološko ispitivanje

Ciljna populacija za ovo istraživanje je naizgled zdrava, opća populacija u različitim djelovima Hrvatske, kako endemskim tako i onim neendemskim za lišmeniozu. Već ranije prepoznata endemska područja su srednja i južna Dalmacija s otocima (27, 33, 82). Područja s mediteranskom klimom povoljnom za održavanje vektora, a koja su smatrana slobodnima od lišmenioze su sjeverna Dalmacija, Istra i Primorje. Nadalje, u istraživanje su uključeni i ispitanici iz dviju županija u kontinentalnom dijelu Hrvatske: Međimurske i Brodsko-posavske županije, koje imaju kontinentalnu klimu te se smatraju slobodnim od vektora i lišmenija.

Uzorci seruma prikupljeni su od 2007. do 2009. i to metodom prigodnog uzorka, od „ostataka“ seruma naizgled zdravih, imunokompetentnih osoba koje su došle na rutinske pretrage krvi ili zbog dragovoljnog darivanja krvi. Laboratoriji su uključeni u istraživanje prema području koju opslužuju: 14 laboratorija je bilo duž jadranske obale, a dva iz kontinentalne Hrvatske. Laboratoriji koji su pristali na suradnju zadržali su tajnost podataka o pacijentima vodeći računa o tome da se u studiju uključe uzorci osoba koje prebivaju u gravitirajućem području te da se isključe višekratni uzorci iste osobe.

Metoda prigodnog uzorka odabrana je zbog terenske izvedivosti i ekonomske isplativosti za ovu vrstu istraživanja. Naime, u studiji koju su u Australiji proveli Kelly i sur. dokazano je da testiranje prigodnih uzoraka seruma, usprkos ograničenjima, osigurava kvalitetnu procjenu imunološkog statusa populacije (97).

Potrebna veličina uzorka za svako od navedenih područja procijenjena je uz pomoć publiciranih statističkih tablica prema zadanoj kombinaciji razine preciznosti, raspona pouzdanosti i vjerojatnosti. Za endemsko područje procijenjena je najmanja veličina uzorka od 1.100 ispitanika kako bi se postigao nivo preciznosti od $\pm 3\%$ uz pretpostavljenu razinu pouzdanosti od 95%, $p=0.5$ uz populaciju veću od 100.000 stanovnika. Za otoke ciljana preciznost za populaciju od >100.000 stanovnika bila je $\pm 5\%$ rezultirala je minimalnom veličinom uzorka od 400, dok je za kontrolne neendemske, kontinentalne

krajeve uz pretpostavljenu maksimalnu seroprevalenciju od 2% ciljana veličina uzorka bila 84 ispitanika kako bi se postigla $\pm 3\%$ razina preciznosti.

Radi procjene valjanosti uzorka napravljena je usporedba udjela ispitanika muškog spola u uzorku s udjelom u populaciji određenog područja dobivenog popisom stanovništva 2011. godine (Tablica 8).

Tablica 8. Razdioba spola u uzorku (n=2.035) i općoj populaciji, prema posljednjem popisu stanovništva 2011. godine

	Broj uzoraka seruma	Postotak ispitanika muškog spola (%)	(95% CI)	Broj stanovnika	Postotak stanovnika muškog spola (%)
Ukupno					
Jadranska obala	1.186	48,15	(45,30% 50,99%)	1.247.133	48,56
Jadranski otoci	653	41,04	(37,27% 44,81%)	113.875	49,75
Kontinentalna Hrvatska	196	69,90	(63,48% 76,32%)	2.923.881	48,02
Područje/Mjesto stanovanja					
Jadranska obala					
Istra i Primorje	117	40,20	(31,32% 49,08%)	467.678	48,35
Sjeverna Dalmacija	159	52,80	(45,04% 60,56%)	255.158	48,93
Srednja Dalmacija	571	51,30	(47,20 55,40%)	419.131	48,56
Južna Dalmacija	339	43,40	(38,12% 48,68%)	105.166	48,62
Kontinentalna Hrvatska					
Brodsko-posavska županija*	107	89,70	(84,0% 95,5%)	158.575	48,60
Međimurska županija	89	46,10	(35,7% 56,4%)	113.804	48,90

CI: raspon pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

*Otklon zbog visokog udjela zdravih darovatelja krvi

Uzorci su transportirani pri 4°C, uz podatke o dobi, spolu i mjestu boravka ispitanika te pohranjeni pri -20°C do testiranja. Na taj način prikupljeni serumi testirani su na prisutnost anti-*Leishmania* protutijela ELISA testom.

Dobiveni rezultati seroprevalencije interpretirani su kategorizacijom na „visoko endemska žarišta“ i „područja s umjerenom seroprevalencijom“. Navedene kategorije

izvedene su iz literaturnih podataka usporedbom s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Naime, u studiji koju su na području Rima i Caltanissette proveli Federico i suradnici, 4% seroprevalencija na lišmenije označena je kao umjerena (98), dok je za „visoko endemsko žarište“ na jugu Francuske u regiji Alpes-Maritimes Marty sa suradnicima dokazao seroprevalenciju od 38% (43). S obzirom da je u potonjoj studiji korištena visoko osjetljiva Western blot tehnika u ovom je istraživanju jednako kategorizirano područje sa seroprevalencijom od 22%, dok je kao umjereno endemsko područje kategoriziran ostatak obale sa 7% seroprevalencijom. Navedena kategorizacija u skladu je i s epidemiološkim podacima o području pojavnosti VL u Hrvatskoj koje se preklapa sa serološki definiranim „visoko endemskim žarištem“ (27, 33, 71, 82, 91).

3. 2. 1. 2. Uzorci obiteljskih kontakata

Članovima obitelji novootkrivenih VL (n=4) i CL (n=2) i jedne bolesnice sumnjive na bolest lokaliziranu u limfnom čvoru, koji su pristali na suradnju, uz anamnestičke i epidemiološke podatke prikupljeni su uzorci seruma te pohranjeni pri -20°C.

Navedeni uzorci testirani su na anti-*Leishmania* protutijela ELISA, IFA i IHA testom.

3. 2. 2. Serološka dijagnostika - postupci

3. 2. 2. 1. Enzimski imuno test (ELISA)

Svi uzorci prikupljeni za seroepidemiološko istraživanje te uzorci obiteljskih kontakata novotkrivenih bolesnika testirani su enzimskim imuno testom za kvalitativno određivanje prisutnosti IgG protutijela na *Leishmania infantum* (NovaLisa™ *Leishmania infantum* IgG ELISA, NovaTec Immunodiagnostica GmbH, Njemačka)

Početno razrjeđenje seruma je 1:100.

U mikrotitarske jažice obložene antigenima lišmenija dodaju se razrijeđeni uzorci seruma, pozitivna, negativna kontrole i dvije kontrole s graničnom vrijednošću (engl. *cut off* controle). Jedna jažica se ostavlja prazna kao slijepa proba. Ukapanje jažice se

ostavljaju inkubirati 60 min na 37°C, zatim se višak nevezanog seruma ispiru odgovarajućim puferom.

U idućem se koraku u sve jažice, osim slijepa probe, dodaje konjugat sastavljen od proteina A obilježenog enzimom, peroksidazom hrena (engl. *horseradish peroxidase*) i inkubira 30 min na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetla. Protein A iz konjugata veže se na Fc fragment IgG protutijela vezanih na antigene lišmenija.

Nakon ispiranja u sve jažice dodaje se supstrat, otopina tetrametilbenzidin/vodikova peroksida (TMB). Peroksidaza hrena (HRP) iz konjugata kombinira se s vodikovim peroksidom (H₂O₂) u supstratu i novonastali HRP-H₂O₂ spoj oksidira bezbojni tetrametilbenzidin koji mijenja boju u plavu. Intenzitet boje upravo je proporcionalan količini vezanih protutijela iz uzorka.

Nakon 15 min inkubacije u mraku reakcija se prekida dodavanjem „stop“ otopine sumporne kiseline u sve jažice, pri čemu se plava boja pozitivnih jažica mijenja u žutu.

Očitavanje:

Apsorbancija otopine mjeri se pri 450/620 nm valne dužine.

Interpretacija:

Test je valjan ako su zadovoljeni uvjeti:

<u>KONTROLA</u>	<u>VRIJEDNOST APSORBANCIJE</u>
Slijepa proba	< 0,100
Negativna kontrola	< 0,200
Cut-off kontrole	0,250 – 0,900
Pozitivna kontrola	Vrijednost jednaka ili veća od <i>cut-off</i> kontrole

Pozitivnim se smatraju uzorci kojima je očitana vrijednost apsorbancije za 10% veća od srednje vrijednosti apsorbancija „*cut-off*“ kontrola.

Negativnim se smatraju uzorci kojima je očitana vrijednost apsorbancije za 10% manja od srednje vrijednosti apsorbancija „*cut-off*“ kontrola.

3. 2. 2. 2. Test neizravne imunofluorescencije (IFA)

Test neizravne imunofluorescencije (IFA) za kvantitativno određivanje prisutnosti protutijela na *Leishmania infantum* u serumu (Leishmania-Spot IF, bioMérieux, Francuska) koristi se u serološkoj dijagnostici lišmenioza u Kliničkom zavodu za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju, Kliničkog bolničkog centra Split.

Istim su testom pretraženi uzorci seruma obiteljskih kontakata oboljelih.

Test se izvodi prema uputama proizvođača. Uzorci seruma se dvostruko serijski razrjeđuju u PBS-u od početnog razrjeđenja 1:40. Test se izvodi u dva koraka; u prvom se protutijela iz seruma vežu na promastigote *Leishmania infantum* kojima su obložena predmetna stakla (Leishmani-Spot IF). Nevezana protutijela se uklanjaju ispiranjem.

U drugom koraku se vezana protutijela dokazuju kozjim anti-humanim imunoglobulinima obilježenim fluoresceinom (Fluoline H + Evans Blue), nevezani elementi se uklanjaju drugim ispiranjem. Kao negativna kontrolu umjesto seruma koristi se PBS.

Očitavanje:

Test se očitava uz pomoć fluorescentnog mikroskopa. Prije očitavanja provjeri se negativna kontrola konjugata – ukoliko pokazuje ikakav znak fluorescencije serija nije valjana i serum treba testirati ponovno.

Negativna reakcija – promastigoti su obojeni crveno, narančasto ili tamno zeleno. Ne vidi se fluorescencija ovojnice.

Pozitivna reakcija – promastigoti imaju manje više fluorescentnu, svijetlo zelenu citoplazmu. Fluorescencija ovojnice i biča kad je uočljiva je osobita.

Titar seruma recipročan je najvećem razrjeđenju u kojem se vidi pozitivna reakcija.

3. 2. 2. 3. Test neizravne hemaglutinacije (IHA)

Uzorci seruma obiteljskih kontakata oboljelih pretraženi su na anti-*Leishmania* protutijela i testom neizravne hemaglutinacije (Cellognost*-Leishmaniasis, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Njemačka).

Cellognost*-Leishmaniasis je test neizravne, pasivne aglutinacije eritrocita. Humani eritrociti krvne grupe O senzibilizirani s *Leishmania* antigenima aglutiniraju u prisutnosti specifičnih protutijela u uzorcima humanog seruma.

Test se izvodi u mikrotitarskim pločicama sa V udubinama prema uputama proizvođača reagensima priskrbljenim u pojedinačnom pakiranju.

Postupak:

Liofilizirane, senzibilizirane, eritrocite treba rekonstituirati s 2,5 ml deionizirane vode. Pripremljena otopina treba ostati najmanje tijekom noći na +2°C do +8°C (ili kroz 2 h na sobnoj temperaturi).

Kvalitativni test Za testiranje se koristi radno razrijeđenje Cellognost*-Leishmaniasis (IHA reagens) s Tris puferom u omjeru 1 : 2 (npr. 2,5 ml Cellognost*-Leishmaniasis s 5,0 ml Tris pufera).

U testiranje se uz serume obavezno uključuju pozitivna i negativna kontrola.

Serumima i kontrolama se doda razrijeđeni IHA reagens, te se pločica treska na miješalici pri 900 do 1000 rpm /15 – 20 sek.

Nakon inkubacije (2 do 24 sata) bez treskanja na sobnoj temperaturi (15° - 25°C) očitati reakciju.

Očitavanje testa

Potpuna aglutinacija stanica (stvaranje mrežice) = pozitivno.

Ravnomjerno po dnu raspoređena aglutinacija uz slabu sedimentaciju = slabo pozitivno.

Stvaranje nakupine poput dugmeta = negativno.

Test se može očitati ako pozitivna kontrola pokazuje hemaglutinaciju ravnomjerno raspoređenu po dnu, a negativna kontrola okruglo nakupljanje eritocita.

3.3. Statistička obrada podataka

Valjanost molekularnih testiranja preparata kao dijagnostičkog/ih testa/ova za prisutnost lišmenioze određena je na temelju 2x2 tablice učestalosti, pri čemu su rezultati seroloških pretraga korišteni kao standard istine za prisutnost patogena. U procjeni valjanosti testova korišteni su parametri specifičnosti, osjetljivosti te proporcija lažno negativnih i lažno pozitivnih nalaza.

U dijelu studije kojem je cilj bio odrediti i usporediti učestalost prevalencije seropozitiviteta u stanovništva koje živi u kontinentalnim dijelovima u odnosu na stanovnike priobalja i otočnu populaciju te s obzirom na ekološke regije, korišten je Pearson χ^2 - test kao mjera povezanosti vrste ekološke regije i seropozitiviteta. Omjer izgleda, njegov 95% raspon pouzdanosti i P-vrijednost pripadajućeg statističkog testa korišteni su u procjeni snage povezanosti. Nadalje, metoda višestruke logističke regresije upotrijebljena je u procjeni mogućih čimbenika rizika povezanih s infekcijom kao što su: dob, spol, prebivalište (unutrašnjost/priobalje/otoci te sjeverozapad/jugoistok). Razina značajnosti za odbacivanje nulte hipoteze postavljena je na 0,05. U slučaju višestrukih testiranja korištena je Bonferroni metoda korekcije za prilagodbu dobivenih P-vrijednosti. Prikupljeni podaci analizirani su uz pomoć statističkog programa SPSS verzije 13.0 (SPSS; Chicago, Illinois).

4. REZULTATI

4. 1. Molekularna dijagnostika lišmenioza iz arhiviranih mikroskopskih preparata

4. 1. 1. Zbirka uzoraka arhiviranih mikroskopskih preparata i osnovne karakteristike ispitanika kojima su pripadali uzorci

Za molekularni dio istraživanja prikupljeni su arhivirani mikroskopski preparati 52 klinička uzorka uzeta osobama kod kojih se sumnjalo na neki oblik lišmenioze.

Većina uzoraka bila je pohranjena u arhivi Odjela za citologiju KBC Split u razdoblju od 1999. do 2010. godine.

Tri su razmaza kožnih promjena uzorkovana tijekom istraživanja (2008.-2010.) u Službi za mikrobiologiju NZJZ Splitsko-dalmatinske županije.

Podatci o završenim i izdanim rezultatima citološkog pregleda prikupljeni su iz protokola navedenih odjela (Tablica 9).

Tablica 9. Vrste uzoraka, stanje prikupljenih mikroskopskih preparata i rezultati ranije obavljenih mikroskopskih pregleda 1999. - 2010. (n=52)

Vrsta uzorka	N=	Mikroskopski nalaz	
		Pozitivno (%)	Negativno (%)
Nebojeni razmaz punktata koštane srži*	40	10 (25,0%)	30 (75,0%)
Obojeni razmaz punktata koštane srži	7	5 (71,4%)	2 (28,6%)
Obojeni razmaz punktata limfnog čvora	1	1 (100%)	0
Obojeni razmaz bioptata kože	4	3 (75,0%)	1 (25,0%)
Ukupno:	52	19 (36,5 %)	33 (63,5%)

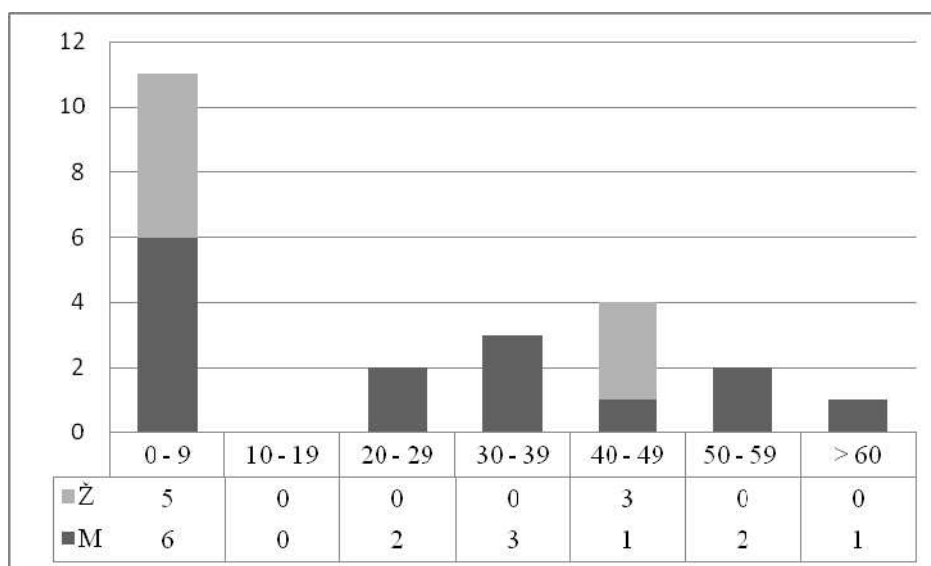
*Mikroskopski su pregledani obojeni preparati od istog uzorka

Najviše je prikupljeno razmaza koštane srži, njih ukupno 47, od čega je 27 uzorkovano osobama koje su u istodobno napravljenom serološkom IFA testu na anti-*Leishmania* protutijela bile pozitivne u titru ≥ 160 , a 20 seronegativnim osobama (titar ≤ 40).

Svi uzorci seronegativnih ispitanika i 20 uzoraka seropozitivnih ispitanika bili su neobojeni, a ostalih 7 uzoraka koštane srži seropozitivnih ispitanika bilo je obojeno (Tablica 9).

Analizom podataka o seropozitivnim bolesnicima, čiji su uzorci prikupljeni za ovo istraživanje, utvrđeno je da se radilo o ukupno 23 bolesnika s VL, a koji su liječeni u Odjelu za zarazne bolesti KBC Split od 1999.-2010. godine. Prosječna dob VL bolesnika bila je 23,7 godina (medijan 23 godine; raspon 7 mjeseci do 74 godine). Osam (35%) je bilo ženskog, a petnaest (65%) muškog spola.

Dobne i spolne karakteristike seropozitivnih ispitanika prikazane su na Slici 3.



Slika 3. Razdioba VL bolesnika po dobi i spolu (n=23), 1999. – 2010.

U istom razdoblju je u Republici Hrvatskoj prijavljeno ukupno 26 oboljelih od kala-azara. Dakle, ovim su istraživanjem prikupljeni arhivirani uzorci razmaza koštane srži više od 88 % svih oboljelih od VL u Hrvatskoj u promatranom 12 godišnjem razdoblju.

Mada je 12 uzoraka koštane srži seropozitivnih osoba bilo mikroskopski negativno, u 11 slučajeva ti su bolesnici na temelju kliničke slike i rezultata serološke pretrage liječeni kao VL.

Jedini izuzetak je najstariji ispitanik (74) koji je uz suspektanu VL imao leukemiju. U studiju je uključen razmaz koštane srži (obojeni preparat) uzorkovan krajem 8. mjeseca 2006., koji je u mikroskopskom pregledu bio negativan. Zbog nejasne kliničke slike i osnovne bolesti bolesnik je upućen na daljnje pretrage u Zagreb gdje mu je ponovljena punkcija koštane srži koja je opet bila mikroskopski negativna na lišmenije. Bolesnik je nakon 2 mjeseca razvio jasnu sliku VL uz mikroskopski pozitivan nalaz amastigota u novim uzorcima koštane srži (nisu sačuvani) i nažalost, usprkos primjenjenoj terapiji, preminuo. Čitavo vrijeme je bio serološki pozitivan.

Među 23 VL bolesnika, čiji su uzorci bili uključeni u studiju, dvojica su imali recidiv bolesti.

Prvi bolesnik, dječak iz Imotskog u dobi od 13 mjeseci je imao prvu epizodu VL, a sa 18 mjeseci recidiv bolesti (VLR). Ukupno su mu napravljene 3 punkcije koštane srži: jedna za vrijeme prve epizode bolesti, a dodatne dvije zbog recidiva bolesti uzorkovane su u razmaku od jednog dana (prvi uzorak je bio mikroskopski negativan, a drugi pozitivan). U studiju su uključeni preparati sva tri uzorka.

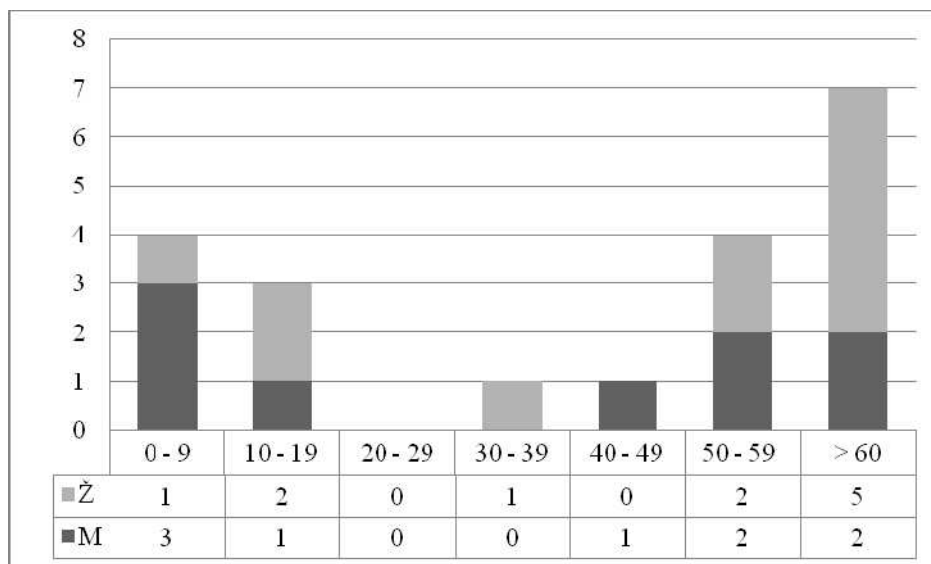
Drugi bolesnik, imunokompromitirani muškarac iz Splita, prvu epizodu VL imao je 2005., u dobi od 32 godine. Zbog osnovnih bolesti, reumatoidnog artritisa i sekundarnog antifosfolipidnog sindroma, liječen je peroralnim antikoagulansima i kortikosteroidima. Usprkos potpuno provedenom liječenju stiboglukonatom razvio je recidive bolesti 2006. i 2007. Liječen je stiboglukonatom u prve dvije epizode bolesti, a potom amfotericinom B. U studiju su uključena njegova tri nebojena uzorka koštane srži: iz 2005. (mikroskopski pozitivan), te iz 2006. i 2007. oba mikroskopski negativna.

Prema mjestu stanovanja bolesnika većinom se radilo o stanovnicima iz šireg splitskog područja. Devet bolesnika je bilo iz Splita, a po dva su bila iz Kaštela, Omiša i Ploča. Po jedan bolesnik je dolazio iz Knina, Žrnovnice, Makarske, Imotskog, Ljubuškog, sa Hvara te iz Dubrovnika. Za 2 bolesnika iz Splita se kao dodatno moguće mjesto zaražavanja navode otoci Šolta i Hvar, a za bolesnicu iz Ljubuškog - Ston.

Uzorci seronegativnih osoba uključeni su u studiju kao kontrolna skupina. Radilo se o osobama kojima je istovremeno napravljena i mikroskopska pretraga koštane srži i serološka pretraga na anti-*Leishmania* protutijela iz čega se dalo zaključiti da su klinički bili suspekti na visceralnu lišmeniozu (SVL).

Prosječna je dob SVL ispitanika bila 42 godine (medijan 52,5 godina; raspon 5 do 76 godina).

Jedanaest ispitanika je bilo ženskog (55%), a devet (45%) muškog spola (Slika 4).



Slika 4. Razdioba SVL ispitanika po dobi i spolu (n=20), 2009. – 2010.

Broj uzoraka oboljelih od CL bio je znatno manji.

Od 2008. do 2010. ukupno su prikupljena četiri uzorka, od čega 3 bioptata kože uzeta osobama kojima je mikroskopski dokazana CL i jedan bioptat kože osobe koja je bila suspekt na CL, ali mikroskopski negativna.

Tablica 10. Vrsta prikupljenih uzoraka, dobne i spolne karakteristike ispitanika sa suspektom kožnom lišmeniozom (n=5)

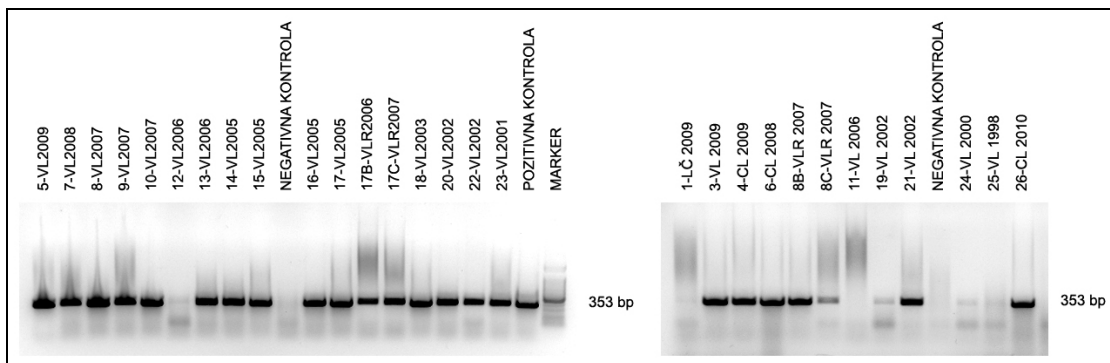
R.b.	Dob (god.)	Spol	Godina	Uzorak	Mikroskopski nalaz
1.	6	M	2008.	Bioptat kože	Pozitivan
2.	5	Ž	2009.	Bioptat kože	Pozitivan
3.	61	Ž	2009.	Punktat limfnog čvora	Pozitivan
4.	47	Ž	2010.	Bioptat kože	Negativan
5.	21	Ž	2010.	Bioptat kože	Pozitivan

Svi preparati kožnih uzoraka su bili obojeni, kao što je bio obojen i jedini uzorak bioptata limfnog čvora (Tablica 10).

4. 1. 2. Dijagnostički SSU-PCR protokol

Molekularnim postupcima ukupno su testirana 52 arhivirana obriska punktata dobivenih od bolesnika s lišmeniozom. Obojeni uzorci su prije testiranja obojavani.

Od ukupno 52 testirana u 23 uzorka metodom ugniježdenog SSU-PCR testa dokazan je za lišmenije specifični dio polimorfne regije male podjedinice ribosomalne RNK veličine 353 bp (Slika 5, Tablica 11).



Slika 5. Detekcija PCR produkata SSU-PCR testa, elektroforezom u 1,2% agaroznom gelu, za neke od uzoraka. Uzorci su označeni kraticom sastavljenom od rednog broja, kliničke slike i godine oboljenja. Rezultati testiranja neobojenih uzoraka su u lijevom, a obojenih u desnom gelu.

Niti jedan od seronegativnih ispitanika (n=20) koji su poslužili kao kontrolna skupina nije bio pozitivan u SSU-PCR testu (0%), a negativan je bio i uzorak jedinog ispitanika suspektnog na CL (Tablica 11).

Tablica 11. Rezultati SSU-PCR testa za sve prikupljene arhivirane mikroskopske preparate 1999-2010 (n=52)

Mikroskopski preparat (n=)	SSU-PCR	
	Pozitivno	Negativno
Razmaz koštane srži VL bolesnika (27)	20	7
Razmaz koštane srži SVL ispitanika (20)	0	20
Razmaz punktata kože CL bolesnika (3)	3	0
Razmaz punktata kože SCL ispitanika (1)	0	1
Razmaz bioptata limfnog čvora (1)	0	1
Ukupno (52)	23	29

SVL- suspektna visceralna lišmenioza; SCL- suspektna kožna lišmenioza

Od 12 prikupljenih obojenih razmaza 11 je pripadalo bolesnicima, a u SSU-PCR testu pozitivno je bilo 6 uzoraka (Tablica 12).

Mikroskopski pozitivni obojeni preparati (n=9) mogu se smatrati sigurno pozitivnim, a SSU-PCR test je bio pozitivan za 5 preparata (osjetljivost 55,56%).

Ipak, upravo su SSU-PCR testom u jednom od testiranih obojenih a mikroskopski negativnih preparata dokazane lišmenije (Tablica 12).

Tablica 12. Usporedni prikaz rezultata ranije obavljenog mikroskopskog pregleda i SSU-PCR testa obojenih mikroskopskih preparata različitih kliničkih uzoraka, 1999.-2010. (n=12)

Uzorci na mikroskopskim preparatima		SSU-PCR	
Vrsta uzorka	Mikroskopski nalaz (n=12)	Pozitivno	Negativno
Koštana srž	Pozitivno (5)	2	3
	Negativno (2)	1	1
Bioptat kože	Pozitivno (3)	3	0
	Negativno (1)	0	1
Limfni čvor	Pozitivno (1)	0	1
Ukupno:		6	6

Dva najstarija sačuvana preparata, iz 1999. i 2000, su bila obojena, SSU-PCR negativna. Negativni rezultati mikroskopskog pregleda i SSU-PCR testa podudaraju se za razmaz koštane srži najstarijeg VL ispitanika, te jedinog CL suspektnog ispitanika.

Među neobojenim uzorcima nalazili su se isključivo razmazi koštane srži prikupljeni kako od seropozitivnih VL bolesnika (n=20) tako i od seronegativnih ispitanika iz kontrolne skupine (n=20). Analizom bolesničkih podataka utvrđeno je da su svi seropozitivni iz ove skupine bili liječeni zbog VL ili recidiva bolesti. Od 20 seropozitivnih bolesnika DNK je dokazan u 17, dok su amastigoti mikroskopski dokazani u 10 arhiviranih uzoraka punktata koštane srži tih bolesnika. Tako se rezultati seroloških

pretraga mogu uzeti kao standard istine za prisutnost patogena, te je na temelju 2x2 tablice učestalosti moguće odrediti valjanost SSU-PCR-a kao dijagnostičkog testa za prisutnost lišmenioze i usporediti ga sa ranije obavljenim mikroskopskim pregledima istih uzoraka (Tablica 13).

Tablica 13. Usporedba molekularnih testova i ranije obavljenog mikroskopskog pregleda za prikupljene arhivirane nebojane razmaze uzoraka koštane srži 2003.–2010. uz rezultat serološke pretrage kao zlatni standard (n=40).

	Bolestan (IFA \geq 160)	Zdrav (IFA \leq 40)	Ukupno
Mikroskopski (+)	10	0	10
Mikroskopski (-)	10	20	30
SSU-PCR (+)	17	0	17
SSU-PCR (-)	3	20	23
Ukupno	20	20	40

U procjeni valjanosti testova korišteni su parametri specifičnosti, osjetljivosti, te proporcija lažno negativnih i lažno pozitivnih nalaza (Tablica 14.).

Tablica 14. Mjere pouzdanosti za ranije obavljeni mikroskopski pregled uzoraka koštane srži i molekularne testove sačuvanih nebojenih razmaza istih uzoraka, 2003.-2010. (n=40)

	Mikroskopski pregled	SSU-PCR
Osjetljivost	50,0%	85,0%
Specifičnost	100,0%	100,0%
Pozitivna prediktivna vrijednost	100,0%	100,0%
Negativna prediktivna vrijednost	66,7%	87,0%

Niti jedan od mikroskopski pozitivnih uzoraka nije bio SSU-PCR negativan kada su analizirani nebojeni uzorci.

Ukupno gledajući u 11 uzoraka lišmenije su otkrivene samo jednom od korištenih metoda; mikroskopskim pregledom (n=3) ili SSU-PCR testom (n=8).

Ako se promotre rezultati učinjenih pretraga za sve uzorke (obojene i nebojene) bolesnika sa jasnom kliničkom slikom (26 VL, 3 CL, 1 LČ) mikroskopskim pregledom su nađeni amastigoti u 19 od 30 uzoraka (osjetljivost 63,3%), SSU-PCR testom u 23 (76,7%), a primjenom oba testa uzročnik je otkriven u 27 (90,0%) uzoraka.

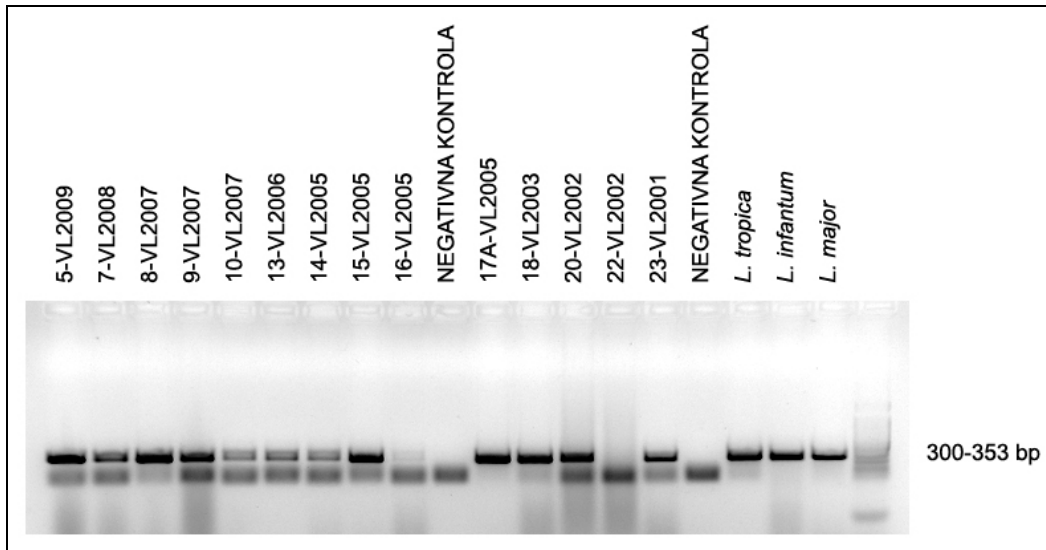
4. 1. 3. Identifikacijski ITS1-PCR protokol

Da bismo identificirali vrstu lišmenije prisutnu u arhiviranim uzorcima od DNK dijela uzoraka koji su bili pozitivni u SSU-PCR testu (n=23) napravljen je identifikacijski ITS1-PCR test.

Isključena su 3 od 6 SSU-PCR pozitivnih uzoraka dvojice bolesnika s recidivom VL, jer je očekivano da se radilo o istoj vrsti. Za pozitivne kontrole dodan je DNK laboratorijskih kontrolnih sojeva *L. tropica*, *L. major* i *L. infantum*.

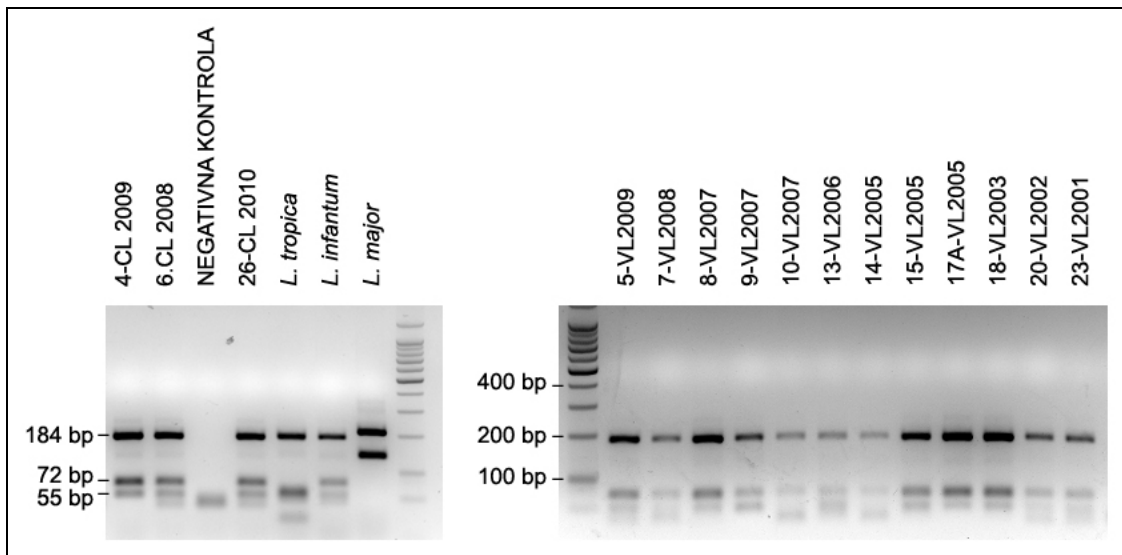
U 18 uzoraka dobiven je PCR produkt očekivane veličine za unutrašnju prepisanu razmaknicu koja razdvaja ssu rRNK i 5.8S rRNK gene u ribosomalnom operonu različitih vrsta lišmenija (Slika 6).

Dva su SSU-PCR pozitivna uzorka bila negativna u ITS1-PCR testu. Radilo se o obojenim uzorcima razmaza koštane srži iz 2002. i 2005. godine (uzorci 16 i 22, Slika 6).



Slika 6. Rezultati amplifikacije ITS1 regije PCR testom za neke od uzoraka. Uzorci su označeni kraticom sastavljenom od rednog broja, kliničke slike i godine oboljenja.

Dobiveni ITS1-PCR produkti podvrgnuti su restrikciji s *Hae* III endonukleazom, a dobiveni produkti elektroforetski razdvojeni u 3% agaroznom gelu (Slika 7)



Slika 7. Identifikacija vrste lišmenije iz kliničkih uzoraka PCR amplifikacijom ITS1 regije te razgradnjom dobivenih produkata enzimom *Hae*III endonukleazom. Uzorci su označeni kraticom sastavljenom od rednog broja, kliničke slike i godine oboljenja.

Za sve izolate elektroforetska RFLP analiza dala je produkte veličine 184, 72 i 55 bp, temeljem čega je *L.infantum* identificirana kao jedina prisutna vrsta, uzročnik kako VL, tako i CL.

4. 2. Istraživanje seroprevalencije lišmenioze u asimptomatskoj populaciji Hrvatske

Za utvrđivanje prisutnosti protutijela u serumima zdravih stanovnika iz različitih područja priobalne i kontinentalne Hrvatske, u periodu od 2007.-2009., ukupno je prikupljeno 2.035 uzoraka. U studiju su bili uključeni ispitanici svih dobnih skupina u rasponu od 8 mjeseci do 88 godina, uz medijan za dob od 42 godine (interkvartilni raspon 21-59). Od ukupnog broja ispitanika njih 975 (47,9%) je bilo muškog, a 1.060 (52,1 %) ženskog spola. Najveći je broj ispitanika (1.186) imao mjesto stanovanja u priobalju, 653 su bili stanovnici otoka, a 196 ispitanika iz kontinentalnog dijela Hrvatske poslužili su kao kontrolna skupina (Tablica 15)

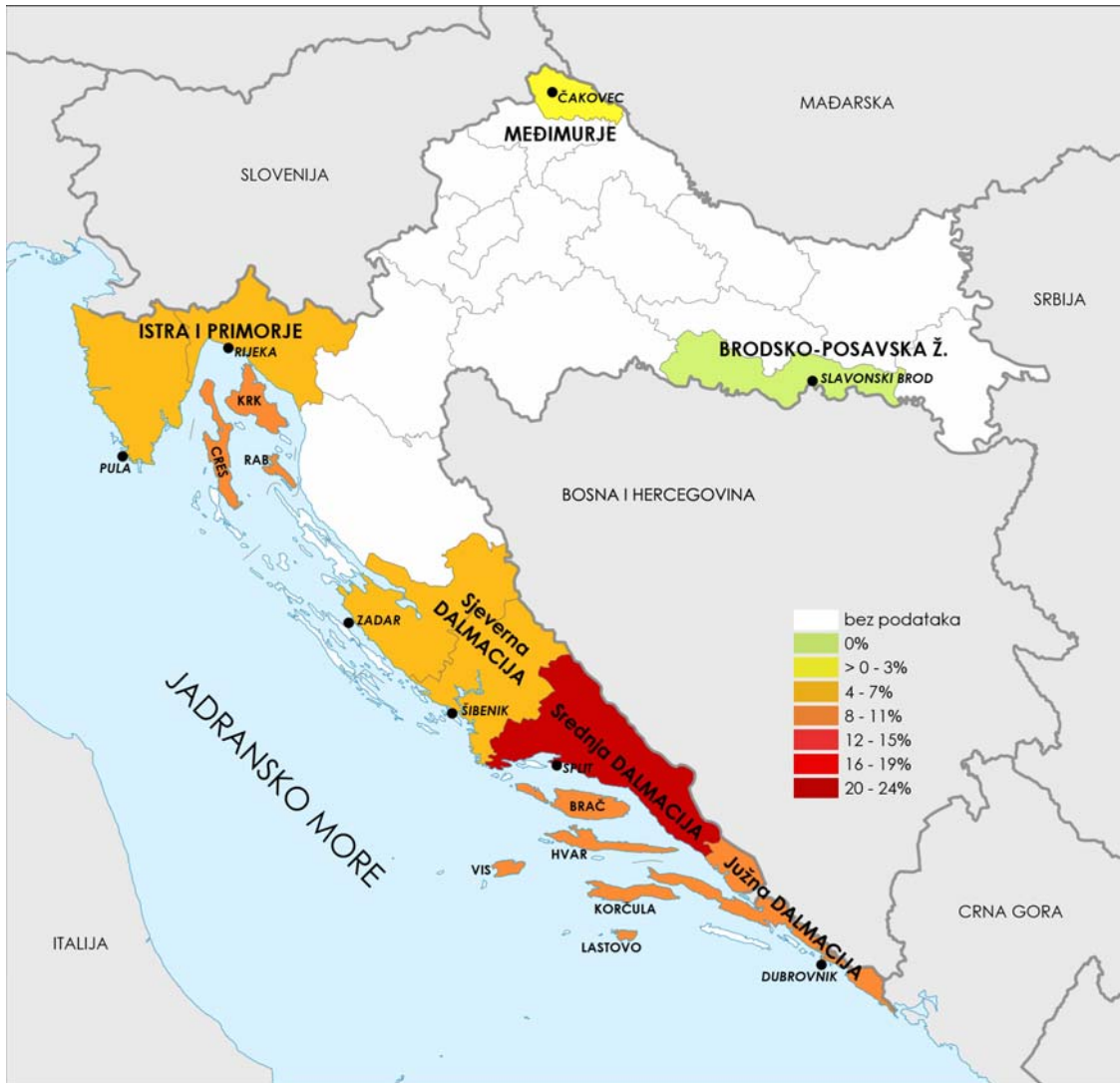
Za sve ispitanike iz priobalja udio muških ispitanika u uzorku uz procijenjeni 95% raspon pouzdanosti (CI) za postotak, u skladu je s postotkom muškog stanovništva za dato područje dobivenim popisom stanovništva 2011. godine. Pri usporedbi udjela muških ispitanika za otočnu populaciju procijenjeni postotak je nešto viši od postotka dobivenog popisom stanovništva. Veliki nesklad u udjelima ispitanika po spolu prisutan je samo u Brodsko-posavskoj županiji u kojoj veći dio ispitanika u uzorku čine dobrovoljni darovatelji krvi.

Tablica 15. Raspodjela ispitanika prema dobi, spolu i mjestu stanovanja, te udio seropozitivnih (n=2.035)

	Broj uzoraka seruma	Dobne skupine ispitanika (godine)								NP	Dobni raspon	Muški (%)	Seropozitivni (%)
		0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	>70				
Ukupno	2035	177	272	250	246	242	315	205	290	38	0 - 88	975 (47,9)	231 (11,4)
Regija / Mjesto stanovanja													
Obala Jadrana	1186	149	206	133	131	146	189	97	107	28	0 - 86	569 (48,0)	169 (14,2)
Istra i Primorje	117	12	13	11	27	17	17	10	10	0	0 - 83	47 (40,2)	5 (4,3)
Sjeverna Dalmacija	159	10	29	19	15	21	36	15	14	0	3 - 84	84 (52,8)	10 (6,3)
Srednja Dalmacija	571	112	117	74	59	63	67	31	33	15	0 - 82	293 (51,3)	127 (22,2)
Južna Dalmacija	339	15	47	29	30	45	68	42	50	13	0 - 86	145 (42,8)	27 (8,0)
Jadranski otoci	653	17	41	70	61	69	110	97	181	7	1 - 88	268 (41,0)	61 (9,3)
Kontinentalna Hrvatska	196	11	25	47	54	27	17	10	2	3	0 - 72	137 (69,9)	1 (0,5)
Brodsko-posavska županija	107	0	12	25	34	19	10	4	0	3	18 - 62	96 (89,7)	0 (0,0)
Međimurska županija	89	11	13	22	20	8	7	6	2	0	0 - 72	41 (46,1)	1 (1,1)

NP - nepoznato

Od ukupno 2.035 testiranih uzoraka seruma 231 (11,4%) je bio pozitivan na anti-*L.infantum* IgG protutijela. Nađene su značajne razlike u seroprevalenciji ispitanika iz različitih dijelova Hrvatske, u rasponu od 0.0% seropozitivnih u Brodsko-Posavskoj županiji do 22,2% u srednjoj Dalmaciji ($\chi^2=112,24$; $df=13$; $P<0,001$) (Slika 7, Tablica 15).



Slika 8. Karta prostorne razdiobe anti-*Leishmania* seropozitiviteta među asimptomatskim stanovništvom različitih dijelova Hrvatske, 2007. – 2009. (n=2.035)

S obzirom na mjesto stanovanja nađena je snažna povezanost seropozitiviteta i prebivališta na obali, otocima ili u kontinentalnom dijelu zemlje ($\chi^2=35,41$; $df=2$; $P<0,001$). Bonferroni metoda korekcije pokazala je da su stanovnici obalnog područja imali značajno višu seroprevalenciju od otočana ($\chi^2=9,27$; $df=1$; $P_{corr}=0,007$) kao i od stanovnika kontinentalne regije ($\chi^2=29,43$; $df=1$; $P_{corr}<0,001$). Nadalje, otočani su imali statistički značajno višu seroprevalenciju u odnosu na kontinentalno stanovništvo ($\chi^2=17,37$; $df=1$; $P_{corr}<0,001$).

Za detaljniju analizu obrasca prostorne raspodjele asimptomatske lišmenioze izračunata je snaga povezanosti seropozitiviteta sa stanovanjem u određenom području: priobalnom, kontinentalnom ili na otocima (Tablica 16).

Tablica 16. Omjer izgleda seropozitiviteta anti-*Leishmania* IgG protutijela prema mjestu stanovanja u usporedbi s prosječnom vrijednošću za zadano područje Hrvatske, 2007. – 2009., (n=2.035)

	P vrijednost	OR	95% CI
Regija /mjesto stanovanja			
Priobalje	Referentna vrijednost: seropozitivitet 14% (95% CI, 12-16%)		
Istra i Primorje	0,002 ^a	0,27	0,11-0,67
Sjeverna Dalmacija	0,006 ^a	0,4	0,21-0,78
Srednja Dalmacija	< 0,002 ^a	1,72	1,33-2,22
Južna Dalmacija	0,002 ^a	0,52	0,34-0,80
Otoci	^b seropozitivitet 9% (8-11%)		
Unutrašnjost	Referentna vrijednost: seropozitivitet 0,2% (0,1-0,9%)		
Brodsko-posavska županija	0,758	0	NP
Međimurje	0,849	2,22	0,14-35,83

OR: omjer izgleda (engl. *odds ratio*); CI: raspon pouzdanosti (engl. *confidence interval*);

NP nije poznato

^a Značajno na razini $\alpha=0,01$.

^b Veličina uzoraka za pojedinačne lokalitete je bila premala za pouzdanu procjenu seroprevalencije.

Značajne razlike u seroprevalenciji opažene su samo u analizi priobalnih područja. Dok je stanovništvo srednje Dalmacije imalo najviši anti-*Leishmania* seropozitivitet i najviši rizik od nastanka lišmenioze (OR 1,72; 95% CI 1,33-2,22; $p < 0,001$), stanovništvo ostalih priobalnih područja je imalo niži rizik (OR od 0,27-0,52; p od 0,002-0,006) u usporedbi sa stopom anticipiranom za ravnomjernu distribuciju.

Mada ovi rezultati jasno potvrđuju da je srednja Dalmacija endemsko žarište lišmenioze, opažene stope seropozitiviteta u ostalim priobalnim područjima (od 4,3% do 8,0%) otkrivaju ih kao endemska područja u kojima je seroprevalencija viša nego u kontinentalnoj Hrvatskoj.

Daljnja analiza spola i dobi kao mogućih čimbenika rizika, nije otkrila povezanost seropozitiviteta sa spolom ($\chi^2=0,11$; $df=1$; $p=0,739$). Naime, od 975 testiranih uzoraka seruma osoba muškog spola protutijela su nađena u njih 113 (11,6%), dok su među 1.060 ženskih uzoraka protutijela nađena u 118 (11,1%) testiranih seruma. Ovaj nalaz je dalje potvrđen multivarijantnom analizom u kojoj je ovisna varijabla seropozitivitet, dok su spol, dob i zemljopisna lokacija uzete za neovisne varijable (Tablica 17).

Nasuprot tomu, pronađena je značajna razlika u medijanu dobi seropozitivnih i seronegativnih ispitanika: 40 godina (interkvartilni raspon 16-58) te 42 godine (22-60), (Mann-Whitney U test, $p=0,039$). Nadalje, u multivarijantnom modelu sa spolom i zemljopisnom distribucijom kao dodatnim nezavisnim varijablama, dob se pokazala značajnim prediktorom seropozitiviteta (ukupni nivo značajnosti $p=0,022$). Stope seroprevalencije za svaku dobnu skupinu ispitanika te pripadajući OR s 95%CI prilagođenim za kovarijable sažeti su u Tablici 17. Anti-*Leishmania* seropozitivitet najvjerojatniji je među osobama dobne skupine 0-9 godina (17,5%; OR 2,19; 95%CI 1,16-4,14). Protutijela su nađena u devetero djece (17,6%) unutar podgrupe mlađih od 4 godine uključujući i jednogodišnju djevojčicu. Podatci nadalje pokazuju da nema ravnomjerne promjene anti-*Leishmania* seropozitiviteta s dobi ispitanika. Umjesto toga, uočljiva je bimodalna distribucija s usporedivo visokim rizikom asimptomatske infekcije među ispitanicima dobnih skupina 0-9, 10-19 i 40-49 godina (OR: 1,84 do 2,19; sve p -

vrijednosti <0,05). Nasuprot tomu, osobe drugih dobnih skupina imali su rizik od asimptomatske infekcije sličan riziku ispitanika u referentnoj dobnj skupini od 30-39 godina (OR: 1,00-1,33; p-vrijednosti: 0,374-0,992).

Tablica 17. Višestruka logistička regresijska analiza anti-*Leishmania* seropozitiviteta s obzirom na dob, spol i mjesto stanovanja u Hrvatskoj, 2007. – 2009. (n=2.035)

Varijable	N testiranih uzoraka seruma	IgG pozitivni (%)	P vrijednost	OR	95% CI
Dobne skupine (godine)					
0-9	177	31 (17,5)	0,016 ^a	2,19	(1,16-4,14)
10-19	272	39 (14,3)	0,048 ^a	1,84	(1,01-3,38)
20-29	250	18 (7,2)	0,992	1,00	(0,50-2,01)
30-39	246	17 (6,9)		Referentna vrijednost	
40-49	242	37 (15,3)	0,015 ^a	2,13	(1,16-3,93)
50-59	315	30 (9,5)	0,621	1,17	(0,63-2,19)
60-69	205	19 (9,3)	0,631	1,18	(0,60-2,36)
>70	290	30 (10,3)	0,374	1,33	(0,71-2,51)
Spol					
Muški	975	113 (11,6)	0,61	1,08	(0,81-1,44)
Ženski	1.060	118 (11,1)		Referentna vrijednost	
Područje					
Otoci	653	61 (9,3)	0,003 ^a	20,37	(2,78-149,2)
Obala	1.198	169 (14,2)	0,001 ^a	28,51	(3,95-205,79)
Unutrašnjost	196	1 (0,5)		Referentna vrijednost	

OR: omjer izgleda (engl. *odds ratio*); CI: raspon pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

^a Značajno na razini $\alpha=0,05$.

4. 3. Testiranje obiteljskih kontakata bolesnika te dijagnosticiranje novooboljelih

Od 2008. do kraja 2010. u studiju su se dobrovoljno uključili članovi obitelji 6 bolesnika novooboljelih od lišmenioze (4 VL i 2 CL).

Ukupno je testirano 26 ispitanika obiteljskih kontakata s prosječnom dobi od 29 godina (medijan 35 godina; raspon 3 do 70 godina).

Osamnaest ispitanika je bilo ženskog (69,23%), a osam (30,77%) muškog spola.

Uzorci seruma obiteljskih kontakata testirani su na anti-*Leishmania* protutijela s tri različita serološka testa: ELISA, IFA i IHA. Većina je testiranih uzoraka (n=18; 69,23%) bila negativna u sva tri testa. Osam je uzoraka (30,77%) seruma bilo pozitivno u IFA testu, ali u niskom titru 1:40. U 6 od 8 uzoraka seruma koji su bili pozitivni u IFA testu protutijela su nađena i ELISA testom i to u blizini „cut off“, a samo dva su bila, opet u niskim titrovima, pozitivna i u IHA testu.

Dvije obitelji stanuju na području Vrgorca, a ostali u Makarskoj, Klisu, Sitnom Gornjem te u Splitu. Obitelj iz Splita je jedina koja ne stanuje u obiteljskoj kući nego u stanu u stambenoj zgradi, no navode kako ljetne mjesece provode u staroj kamenoj obiteljskoj kući na Hvaru. Većina navodi prisutnost pasa u susjedstvu (5/6), a u jednom slučaju je susjedov pas eutanaziran zbog CanL. Svi navode ugrize insekata, ali ne razlučuju da li se radilo o nevidima ili komarcima.

Nadalje od 2011. godine u istraživačkom laboratoriju Katedre za medicinsku mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, 9 različitih kliničkih uzoraka (3 bioptata kože, 5 punktata koštane srži i 1 bioptat limfnog čvora) pretraženo je na DNK lišmenija SSU-PCR metodom. Dva su uzorka koštane srži bila jasno pozitivna u testu, a uzorak limfnog čvora je bio slabo pozitivan te je zbog nejasnog nalaza upućen u Hrvatski veterinarski institut Zagreb gdje je ljubaznošću dr. sc. Relje Becka ponovljeno testiranje i potvrđeno da se radilo o *Leishmania infantum*. Uzorak je uzorkovan 14 godišnjoj djevojčici sa Šolte, otoka koji se kao mjesto zaražavanja navodi i za drugu ispitanicu sa manifestacijom bolesti ograničenom na limfni čvor. Prikupljeni su uzorci seruma navedene bolesnice i njezinih obiteljskih kontakata i testirani s dva testa: IFA i IHA. Svi uzorci uključujući i onaj bolesnice bili su negativni na anti-*Leishmania* protutijela.

5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem molekularnim metodama identificirana je vrsta lišmenije koja uzrokuje bolest u ljudi u endemskim dijelovima Hrvatske. Analizirani su arhivirani mikroskopski preparati uzoraka koštane srži 23 bolesnika liječena od visceralne lišmenioze u vremenu od 1999. do 2010. godine, čime je obuhvaćeno 88,5% svih oboljelih od VL u Hrvatskoj u istom razdoblju (94). Od dokazanih CL bolesnika prikupljena su 3 uzorka. RFLP analizom elektroforetski razdvojenih fragmenata ITS1-PCR produkata razgrađenih restrikcijom endonukleazom *Hae* III, utvrđeno je da je jedina prisutna vrsta, uzročnik kako VL tako i CL, zoonotska *Leishmania infantum*.

Nalaz *L.infantum* u skladu je s izolacijom i identifikacijom iste vrste u ostalim europskim zemljama mediteranskog bazena: Italiji, Francuskoj, Španjolskoj, u kojima je jedini endemski uzročnik VL i CL (74, 99, 100). Od ostalih vrsta u Grčkoj se još pojavljuje *L. tropica* kao uzročnik sporadičnih slučajeva CL (101). O daljnjoj proširenosti te vrste po Balkanskom poluotoku nema podataka, a ukoliko je to moguće na temelju malog broja CL uzoraka, mi smo za sada isključili tu mogućnost za naše priobalje. Identifikacija *L.infantum* u skladu je s veterinarskim nalazima u Hrvatskoj (71, 88, 89, 102), te ranije objavljenim kliničkim i epidemiološkim podacima o lišmeniozi u ljudi (27, 33, 82, 91). Još je Tartaglia opisao karakteristike bolesti koje su ukazivale da je upravo *L.infantum*, a ne *L.donovani* uzročnik VL u Hrvatskoj: češće obolijevanje djece, povezanost sa životinjskim rezervoarom u pasa, izostanak nastanka PKDL, lišmenida (27). Zbog nedostatka arhiviranih uzoraka nije moguće retrogradno zaključivanje o uzročniku CL, koja se proširila nakon II. svjetskog rata, te zahvaljujući poduzetim terapijskim i epidemiološkim mjerama povukla. Na moguće importiranje drugih vrsta iz Afrike i Grčke, zbog prisutnih stranih trupa i migracija stanovnika već je ukazano (27). Što se tiče analize za ovo istraživanje prikupljenih CL uzoraka, nalaz *L.infantum* u skladu je sa sporadičnim pojavljivanjem i prijavljivanjem CL u Hrvatskoj (82, 103). Naime, ova vrsta je slabo dermatotropna (73). Uvoz stranih vrsta lišmenija, kakav se možda dogodio 40-tih godina prošlog stoljeća, predstavlja stalnu opasnost koje trebaju biti svjesni liječnici koji

skrbe o osobama koje iz turističkih ili poslovnih razloga putuju u endemske krajeve. Ovo se osobito odnosi na hrvatske vojnike stacionirane na Bliskom Istoku (104).

Drugi dio molekularnog testiranja imao je za cilj utvrditi primjenjivost PCR testova na arhiviranim uzorcima sačuvanim iz rutine dijagnostičkih laboratorija u endemskom dijelu Hrvatske, te usporediti njihovu osjetljivost i specifičnost s ranije obavljenim mikroskopskim pregledom istih uzoraka. Dijagnostički SSU-PCR test primjenjen je na sve uzorke, dobivene od bolesnika (n=31) i zdravih kontrola (n=21). DNK *L. infantum* - je bio pozitivan u 23 bolesnička uzorka. Niti jedan od testiranih kontrolnih uzorka nije bio pozitivan ovim testom što ukazuje na 100% specifičnost testa kakva je već ranije opisana za molekularnu dijagnostiku lišmenioza (55, 105,). Usporedbom testova primjenjenih na uzorcima bolesnika s jasnom kliničkom slikom (n=30) SSU-PCR test je pokazao višu osjetljivost (76,7%) od osjetljivosti mikroskopskog pregleda (63,3%), mada nešto nižu od one koju su opazili drugi autori (55, 105). Viša je osjetljivost dobivena u SSU-PCR testu primjenjenom na neobojenim (85,0%) nego na obojenim (55,6%) preparatima. Inhibitorni utjecaj bojenja bio je izraženiji na ITS1-PCR testu koji je bio negativan i za dva SSU-PCR pozitivna obojena uzorka. Negativan utjecaj bojenja na rezultate PCR testova nije zabilježen u svim istraživanjima, primjerice Motazedian i sur. nisu imali niti jedan PCR negativan, a mikroskopski pozitivan obojeni uzorak, no kPCR test kojeg su koristili neki istraživači su našli da je više osjetljivosti od testova korištenim u našem istraživanju (59, 105). Nadalje većina takvih istraživanja rađena je na uzorcima kože, koji su i u našem istraživanju bili 100% pozitivni s oba molekularna testa, ili su DNK ekstrakti purificirani dodatnim postupcima (55) ili su obojeni preparati, za razliku od naših, bili zaštićeni pokrovnim staklom zalijepljenim akrilnim sredstvom (54). Među mikroskopski pozitivnim, PCR negativnim uzorcima nalazili su se stariji sačuvani obojeni preparati (iz 1999., 2000. i 2003. godine) te uzorak limfnog čvora iz 2009. koji je zbog neobičnosti nalaza višekratno mikroskopiran i izlagan imerzionim sredstvima.

Molekularna potvrda lišmenija u uzorcima koji su bili mikroskopski negativni potvrdila je ispravnost postavljene dijagnoze u toj skupini bolesnika (n=8). Naime oni su na temelju kliničke slike i pozitivnog nalaza IFA testa dijagnosticirani i liječeni kao VL

bolesnici što je u skladu s preporukama za prvu epizodu VL (34). Osobito su korisni PCR rezultati za bolesnike (n=2) u kojih se je pojavio recidiv VL, jer pozitivan serološki nalaz nije dovoljan za potvrdu dijagnoze. Sva 4 uzorka tih bolesnika bila su pozitivna u PCR testu, a 3 mikroskopski negativna. Raspoloživost molekularnih metoda uvelike bi bila olakšala kliničarima postavljanje dijagnoze, a u jednom slučaju i poštedila bolesnika od uzastopnog podvrgavanja invazivnoj punkciji koštane srži.

Mikroskopski pregled razmaza koštane srži spada u rutinske dijagnostičke protokole za klinička stanja diferencijalno dijagnostički srodna VL te budući da se radi o relativno jeftinom testiranju visoke specifičnosti, nema potrebe za ukidanjem te pretrage. Istodobnom primjenom mikroskopskog pregleda i molekularnog testa u našem istraživanju uzročnik je otkriven u 90,0% svih uzoraka. Uvođenjem molekularnih testova u rutinu za PCR testiranje moglo bi se koristiti nebojene uzorke ili još bolje uzorke za PCR analizu slati na filter papiru (54, 105).

S ciljem utvrđivanja prevalencije asimptomatske lišmenioze u općoj populaciji Hrvatske, te otkrivanja zemljopisne proširenosti bolesti prikupljeno je 2.035 uzoraka seruma stanovnika različitih zemljopisnih i ekoloških dijelova Hrvatske. Na anti-*L.infantum* IgG protutijela bio je pozitivan 231 (11,4%) uzorak. Rezultati istraživanja ukazuju na snažnu povezanost seropozitiveta i mjesta prebivanja (jadranska obala i otoci) te dobnih skupina. Nalaz seropozitivnih ispitanika u sjevernom priobalju i otocima (Istra i Primorje) gdje nema endemski prisutne lišmenioze ukazuje na moguće širenje lišmenija prema sjeveru.

I ovim je istraživanjem potvrđeno visoko endemsko žarište lišmenioze na području srednje dalmatinske obale u skladu sa dosadašnjim podacima o prijavama kako humane tako i lišmenioze pasa (27, 33, 71, 79, 82, 91). Prema tim istim podacima sjeverozapadno jadransko priobalje: područje Istre, Primorja i sjeverne Dalmacije smatra se neendemskim (27, 33, 71, 79, 82, 91). Na moguće promjene u zemljopisnoj proširenosti lišmenioze u Hrvatskoj ukazao je prvi opisani slučaj VL u bolesnika koji se najvjerojatnije zarazio tijekom boravka na Velebitu (106). Rezultati našeg ispitivanja na tragu su ovog opažanja jer ukazuju na prisutnost asimptomatske lišmenioze duž čitave

jadranske obale i otoka. Ovisno o zemljopisnom području pronađena je umjerena do visoka prevalencija asimptomatskih infekcija (4-22%).

Istraživanja provedena u drugim Mediteranskim zemljama također otkrivaju varijabilnu seroprevalenciju od 0,5 do 56% u ovisnosti o studiranom zemljopisnom području, ali i o korištenom serološkom testu (46, 107). U našem istraživanju koristili smo komercijalni ELISA test kao relativno jednostavan način ispitivanja velikog broja uzoraka seruma. Uzorci su prikupljeni metodom prigodnog uzorka od ostataka seruma u dijagnostičkim laboratorijima zbog čega su prikupljeni podatci o bolesnicima bili oskudni (dob, spol, mjesto prebivanja) bez mogućnosti dobivanja dodatnih podataka o eventualnim putovanjima i bez mogućnosti daljnjeg praćenja ispitanika kroz neko vrijeme. Usprkos ograničenjima ovaj način prikupljanja uzoraka seruma, kao što su pokazali Kelly i sur, prikladan je za dobivanje korisnih podataka o seroprevalenciji (97). Iako su uzorci prikupljeni od 2007. do 2009. budući da je poznata dugotrajna perzistencija anti-*Leishmania* protutijela u serumu, to ne bi trebalo utjecati na kvalitetu nalaza (40, 108.). Od ostalih čimbenika koji umanjuju snagu ovog istraživanja treba spomenuti otklon zbog visokog udjela dobrovoljnih davatelja krvi među ispitanicima Brodsko-Posavske županije, no kako je njihov udio u ukupnom broju ispitanika malen nije za očekivati da je utjecao na rezultate.

U srednjoj Dalmaciji pronađena je prevalencija od 22,2%, značajno viša nego u ostalim obalnim područjima (OR 1,72; 95% CI 1,33-2,22; $p < 0.001$), što je u skladu s dobro dokumentiranim rezervoarom bolesti u pasa, kao i višekratno utvrđenom prisutnosti za lišmenije kompetentnih vektora (71, 88-91). Opažena visoka prevalencija asimptomatskih *Leishmania* infekcija među stanovništvom tog područja očekivana je i s obzirom na činjenicu da je navedeno područje aktivno žarište sa najvišim brojem potvrđenih slučajeva humane VL (33, 82, 94). Većina slučajeva VL dijagnosticiranih u Hrvatskoj javlja se upravo u srednjoj Dalmaciji, gdje je tijekom perioda istraživanja 2007.-2009. otkriveno sedam novih bolesnika uz srednju godišnju incidenciju od 0,5/100.000 stanovnika. U južnoj Dalmaciji izloženost lišmenijama je veća od očekivane (8%)

usprkos malom broju kliničkih slučajeva bolesti i naizgled manjem riziku u odnosu na srednju Dalmaciju.

Kao što je i očekivano seroprevalencija stanovnika dviju županija iz kontinentalne Hrvatske, Brodsko-Posavinske i Međimurja, značajno je niža. Svi su ispitanici bili seronegativni, osim jedne 40-togodišnje ispitanice. Kako se i u kontinentalnim zemljama Europe javljaju importirani slučajevi bolesti u turista, ne može se isključiti mogućnost da je ispitanica došla u kontakt s uzročnikom tijekom mogućeg ljetnog boravka na jadranskoj obali (64-67). Istu mogućnost treba uzeti u obzir i pri interpretaciji više od očekivane seroprevalencije u stanovnika sjevernijih dijelova priobalja. Opaženo moguće širenje bolesti na sjever u skladu je sa sve češćim navodima o širenju vektora u sjevernije dijelove endemskih zemalja i sjevernije zemlje Europe (21, 23, 75, 109). Osobito u nedavno opisanom nalazu *Phlebotomus* spp. u južnim dijelovima Mađarske u blizini granice s Hrvatskom (92). Mađarska se do nedavno smatrala neendemskom zemljom u kojoj nema autohtonih slučajeva lišmenioze, da bi Tanczos i sur. 2012. opisali prvi slučaj autohtone lišmenioze u pasa (93). Asimptomatska lišmenioza, 4,5% seropozitivnih, otkrivena je i u Austriji (108).

Slično rezultatima drugih seroepidemioloških studija (46-49) i ovo istraživanje je pokazalo da nema značajne razlike u prevalenciji seropozitiviteta među spolovima, što govori o jednakoj izloženosti stanovništva usprkos povećanom riziku od razvoja bolesti opaženom kod osoba muškog spola.

Kada se promatra seropozitivitet u odnosu na dob ispitanika rezultati ovog istraživanja se razlikuju od ostalih studija. Naime, dobili smo bimodalnu distribuciju seropozitiviteta u asimptomatskoj populaciji s obzirom na dob, s većom učestalosti među mlađim (0-19 godina) i starijim (40-49 godina). Dobna distribucija se spominje u nekoliko istraživanja. U njima se mahom navodi porast seropozitiviteta s dobi ukazujući na rastuću izloženost *L. infantum* s porastom godina života (46-48). Druge studije ne navode razlike među dobnim skupinama (49, 110). Nadalje, Davies i sur, navode izraziti pad seropozitiviteta u starijoj životnoj dobi (111). Potrebno je navesti da u većinu ovih studija nisu bili uključeni ispitanici mlađi od 18 godina ili da uzorci nisu bili ravnomjerno raspoređeni s

obzirom na dob što umanjuje snagu zaključivanja za dobne skupine zastupljene manjim brojem ispitanika. Istraživanje provedeno ELISA testom u Brazilu otkrilo je 28,5% pozitivnih seruma djece u dobnoj skupini od 0-5 godina i ukazalo povezanost infekcije s životnom dobi od ≥ 2 years (112). U našem istraživanju seropozitivitet je najvjerojatniji među ispitanicima dobne skupine 0-9 godina (17,5%; OR 2,19; 95%CI 1,16-4,14; p 0,016). Kako je u Hrvatskoj visceralna lišmenioza još uvijek češća u djece (33, 82) postoji mogućnost da se među seropozitivnim ispitanicima nalaze oni u kojih će se možda pojaviti manifestna bolest. Da bi se razjasnilo ovo opažanje potrebno je napraviti dodatna, drugačije dizajnirana istraživanja, s manjim brojem ispitanika koji bi bili praćeni i retestirani kroz neko vrijeme.

Analizom podataka dobivenih od obiteljskih kontakata novoboljelih (n=26) potvrđena je izloženost ranije poznatim rizičnim čimbenicima za širenje bolesti, kao što su stanovanje u obiteljskoj kući u endemskom području, blizina pasa, izloženost insektima. Serološkim pretraživanjem njihovih uzoraka seruma na anti-*Leishmania* protutijela s tri različita serološka testa dobili smo niske titrove protutijela, pri čemu je najviše uzoraka bilo pozitivno u IFA testu, a najmanje u IHA testu. S obzirom na mali broj ispitanika, odsutnost kliničke slike i niske vrijednosti titrova nije moguće donijeti valjane zaključke o testiranim metodama.

Lišmenioze su heterogena skupina bolesti s više uključenih čimbenika: od uzročnika, preko rezervoara i vektora, do čovjeka, kao domaćina za bolest i kao čimbenika koji intenzivno utječe na okoliš i ravnotežu ekoloških sustava. Našim istraživanjem pokazali smo da su lišmenioze prisutne u našoj sredini, kako u dijelovima zemlje koji su poznati po svom endemicitetu tako i šire. Nadalje, identificirali smo endemski prisutnu vrstu i potvrdili da se molekularnim testovima može iz arhiviranih uzoraka dijagnosticirati bolest. S obzirom da je endemski prisutna vrsta zoonotska *L. infantum* u prevenciji i eradikaciji bolesti bitan je multidisciplinarni pristup koji će poduzetim mjerama smanjiti rezervoar bolesti. Nadalje, kako je upravo žarišni dio obale turistički atraktivan važno je podići svijest o mogućem eksportiranju bolesti izvan endemskog područja. Liječnici bi u osoba koje imaju nerazjašnjena febrilna stanja, a koje u anamnezi navode boravak

tijekom ljetnih mjeseci na jadranskoj obali ili žive u mogućem proširenom endemskom području, trebali u diferencijalnu dijagnozu uključiti i lišmeniozu. Osobito ako se radi o osobama smanjene imunosti. Pri postavljanju dijagnoze od koristi su molekularni testovi kojima je i ovim istraživanjem potvrđena učinkovitost u različitim kliničkim uzorcima. Nadalje, opažen seropozitivitet u ispitanika izvan endemskog dijela obale i moguće širenje bolesti na sjever potrebno je dodatno istražiti i potvrditi. Stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja kako klinička, tako epidemiološka i parazitološka, kako bi se razjasnili trendovi prisutni u održavanju i prenošenju ove zanemarene parazitoze i njezin utjecaj na zdravlje ljudi i životinja u različitim dijelovima Hrvatske.

6. ZAKLJUČAK

Molekularnim testiranjem kliničkih uzoraka arhiviranih na mikroskopskim preparatima (1999.-2010.) identificirana je zoonotska *Leishmania infantum* kao jedini prisutni uzročnik visceralne i kožne lišmenioze u endemskom dijelu Hrvatske.

Potvrđena je dijagnostička učinkovitost molekularnih testova u testiranju uzoraka pohranjenih na mikroskopskima preparatima starim i desetak godina, osobito ukoliko se radi o nebojenim uzorcima.

Primjenom navedenih testova može se i naknadno postaviti dijagnoza lišmenioze iz sačuvanih uzoraka, čime se otklanja nužnost ponovnog uzimanja uzoraka invazivnim i bolnim postupcima kao što je punkcija koštane srži.

Istodobna primjena mikroskopskog pregleda i molekularnog testiranja bioloških uzoraka rezultira vrlo visokom osjetljivošću pretraga (90,0%).

Serološkim testiranjem asimptomatskog stanovništva iz različitih ekoloških dijelova Hrvatske potvrđeno je žarište visoke endemičnosti u srednjoj Dalmaciji.

Utvrđena je prisutnost asimptomatske lišmenioze u sjevernijim dijelovima priobalja, izvan prepoznatog endemskog područja. Navedeni nalaz je potrebno dalje istražiti.

Seroprevalencija ne pokazuje značajne razlike po spolu, ali pokazuje bimodalnu dobnu distribuciju, s većom učestalosti među mlađim (0-19 godina) i starijim (40-49 godina).

Djeca u dobi od 0-9 godina najosjetljivija su dobn skupina za asimptomatsku i simptomatsku *Leishmania* infekciju

7. SAŽETAK

Lišmenioza je jedina tropska parazitoza endemski prisutna u Hrvatskoj. Kako bi otkrili i identificirali prisutne vrste lišmenija prikupljeni su sačuvani klinički uzorci oboljelih od visceralne (VL) i kožne lišmenioze (CL) arhivirani na mikroskopskim preparatima (1999.-2010.). Testirani su s dva različita PCR testa; dijagnostičkim SSU-rRNA-PCR i identifikacijskim ITS1-PCR testom. PCR produkti potonjeg testa podvrgnuti su razgradnji *Hae* III restrikcijskom endonukleazom i dobiveni fragmenti elektroforetski razdvojeni radi RFLP analize. Utvrđeno je da je jedina prisutna vrsta, koja uzrokuje VL i CL, zoonotska *Leishmania infantum*. Molekularne metode pokazale su veću osjetljivost pri testiranju nebojenih (85,0%) u odnosu na obojena mikroskopska stakla (55,6%).

Drugi veliki cilj ovog rada bio je utvrditi seroprevalenciju anti-*Leishmania* protutijela u asimptomatskih stanovnika različitih ekoloških regija Hrvatske. U tu su svrhu prikupljeni uzorci seruma 2.035 imunokompetentnih stanovnika (priobalje n = 1.186; otoci, n = 653; kontinent n = 196). Uzorci su testirani ELISA testom i ukupno je 231 (11,4%) uzorak seruma bio pozitivan na anti-*Leishmania* protutijela. Metoda višestruke logističke regresije ukazala je na povezanost seropozitiviteta s mjestom stanovanja i dobi ispitanika. Visoko endemski fokus potvrđen je za područje srednje Dalmacije (seroprevalencija 22,2%; OR: 1,72; 95% raspon pouzdanosti [CI]: 1,33-2,22). Umjerena do visoka anti-*Leishmania* seroprevalencija nađena je duž čitave jadranske obale te na otocima (od 4,0% do 22,2%) uključujući i dijelove koji se smatraju neendemskim. Stanovništvo priobalja i otoka ima značajno viši seropozitivitet u odnosu na stanovnike kontinentalne Hrvatske (odds ratios [OR] od 20,4 do 28,5). Prema dobi, dobili smo bimodalnu distribuciju seropozitiviteta, s većom učestalosti među mlađim (0-19 godina) i starijim (40-49 godina) ispitanicima. Djeca u dobi od 0-9 godina najosjetljivija su dobna skupina za asimptomatsku *Leishmania* infekciju (OR 2,19; 95% CI 1,16-4,14).

8. SUMMARY

LEISHMANIASIS IN CROATIA – DISTRIBUTION AND PARASITOLOGIC DIAGNOSIS OF SYMPTOMATIC AND ASYMPTOMATIC INFECTIONS

Two different molecular assays, SSU-PCR and ITS1-PCR, were used to detect and identify leishmania in archived microscopic slides of different samples collected from patients in endemic part of Croatia (1999-2010). Molecular methods were more successful using unstained than stained slides (sensitivity 85.00% and 55.56% respectively). Digestion of ITS1-PCR product with the restriction enzyme *Hae* III identified zoonotic *Leishmania infantum* as the only species present.

To assess the anti-*Leishmania* seroprevalence sera from 2,035 immunocompetent residents of Croatia (Adriatic coast, n = 1,186; Adriatic islands, n = 653; mainland, n = 196), were tested by an enzyme immunoassay. A total of 231 (11.4%) samples were positive. Multivariate analysis revealed that seropositivity was associated with geographic location and age. Highly endemic focus was identified in the central coastal Dalmatia (seroprevalence 22.2%; OR: 1.72; 95% confidence interval [CI]: 1.33-2.22). Moderate to high anti-*Leishmania* seroprevalence was found throughout the eastern Adriatic coast and islands (from 4.0% to 22.2%) including the sites previously considered nonendemic. Residents of coastal areas and islands were significantly more seropositive than mainland residents (odds ratios [OR] from 20.37 to 28.51). Regarding age, children aged 0-9 years were the most vulnerable group for asymptomatic *Leishmania* infection (OR 2.19; 95% CI 1.16-4.14).

9. POPIS LITERATURE

1. Richter B. Medicinska parasitologija. 6.izd. Zagreb: Merkur A. B. D.; 2001.
2. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 4. izd. Washington DC: ASM Press; 2001.
3. Bradarić N, Ivić I. Lišmenijaza: kliničke osobitosti u djece. Paediatr Croat 2005;49(Supl 1):202-11.
4. Barrois M, Riou G, Galibert F. Complete nucleotide sequence of minicircle kinetoplast DNA from *Trypanosoma equiperdum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78(6):3323-7.
5. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27(5):305-18.
6. Dantas-Torres F. Ticks as vectors of Leishmania parasites. Trends Parasitol. 2011;27(4):155-9.
7. Kasap OE, Alten B. Comparative demography of the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) at constant temperatures. J Vector Ecol. 2006;31(2):378-85
8. Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Díaz V, Morillas-Márquez F. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. Emerg Infect Dis. 2009;15(5):795-8.
9. Volf P, Benkova I, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. Int J Parasitol. 2007;37(6):589-93.
10. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends Parasitol. 2006;22(9):439-45. Epub 2006 Jul 14.
11. Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasit Vectors. 2012;5:276. doi: 10.1186/1756-3305-5-276.
12. Cox FEG. Taxonomy and Classification of Human Parasites. U: Murray PR Manual of Clinical Microbiology. VIII izd. ASM Press, Washington DC, 2003. 1897-1902.

13. Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(2):109-18. doi: 10.1007/s10096-011-1276-0.
14. Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol*. 2010;26(10):466-9.
15. Schonian G, Mauricio I, Gramiccia M, Canavate C, Boelaert M, Dujardin JC. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol*. 2008; 24: 135-42.
16. Pratlong F, Dereure J, Ravel C, Lami P, Balard Y, Serres G, Lanotte G, Rioux JA, Dedet JP. Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Trop Med Int Health*. 2009;14(9):1071-85.
17. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*. 2000;16(4):142-4.
18. Bañuls AL, Bastien P, Pomares C, Arevalo J, Fisa R, Hide M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(10):1451-61.
19. Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, Van Gompel A, Clerinx J, Dujardin JC. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill*. 2013;18(30):20543
20. Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 2000;16(5):188-9.
21. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbek Y, Boelaert M. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 1013-8.
22. Gramiccia M. Recent advances in leishmaniasis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*. 2011; 181: 23-30.
23. Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*. 2010; 15(10): 19505.

24. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999;354(9185):1191-9.
25. Cascio A, Calattini S, Colomba C, Scalamogna C, Galazzi M, Pizzuto M, Camilli R, Gramiccia M, Titone L, Corbelino M, Antinori S. Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. *Pediatrics*. 2002; 109: E27.
26. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS Pathog*. 2013;9(1):e1003053. doi: 10.1371/journal.ppat.1003053.
27. Tartaglia P. Visceralna i kožna lišmenijaza u Dalmaciji. *Lijec Vjesn* 1957; 79: 511-22.
28. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(3):191-9. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70043-4.
29. Xynos ID, Tektonidou MG, Pikazis D, Sipsas NV. Leishmaniasis, autoimmune rheumatic disease, and anti-tumor necrosis factor therapy, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(6):956-9.
30. Weisser M, Khanlari B, Terracciano L, Arber C, Gratwohl A, Bassetti S, Hatz C, Battegay M, Flückiger U. Visceral leishmaniasis: a threat to immunocompromised patients in non-endemic areas? *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(8):751-3
31. Pittalis S, Nicastrì E, Spinazzola F, Ghirga P, De Marco M, Paglia MG, Narciso P. *Leishmania infantum* leishmaniasis in corticosteroid-treated patients. *BMC Infect Dis*. 2006;6:177.
32. Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, Alvar J. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 2343-7.
33. Punda-Polić V, Sardelic S, Bradaric N. Visceral leishmaniasis in southern Croatia. *Lancet*. 1998; 351:188.
34. Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalamogna C, Calattini S, Corsico L, Persico T, Adriani B, Magni C, Guaraldi G, Gaiera G, Ludovisi A, Gramiccia M, Galli M, Moroni M, Corbellino M, Antinori S. Role of PCR in diagnosis and prognosis of

- visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 357-61.
35. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(5):951-8.
 36. Evans DA. *Leishmania*. U: Taylor AER. ur. In vitro methods for parasite cultivation. Academic press, London, 1987. 52-74.
 37. Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(3):374-89.
 38. Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol.* 1995;33(5):1145-9.
 39. World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Geneva: WHO; 2010. WHO technical report series; no. 949. Dostupno na: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO TRS 949_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf)
 40. De Almeida Silva L, Romero HD, Prata A, Costa RT, Nascimento E, Carvalho SF, Rodrigues V. Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(4):739-43.
 41. Nigro L, Vinci C, Romano F, Russo R. Comparison of the indirect immunofluorescent antibody test and the direct agglutination test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected subjects. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15(10):832-5.
 42. Mary C, Lamouroux D, Dunan S, Quilici M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47(6):764-71.
 43. Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Rahal A, Gari-Toussaint M, Le Fichoux Y. 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). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994 ;88(6):658-9.

44. Punda-Polić V, Bradarić N, Marty P, Lelièvre A. Serological response to *Leishmania infantum* in a patient treated with prednisone. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998;92(6):731-3.
45. Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ.* 2006;333(7571):723.
46. Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuglio A, Romano A, Ferroglia E. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 131-6.
47. Garrote JI, Gutiérrez MP, Izquierdo RL, Dueñas MA, Zarzosa P, Cañavate C, El Bali M, Almaraz A, Bratos MA, Berbel C, Rodríguez-Torres A, Domingo AO. Seroepidemiologic study of *Leishmania infantum* infection in Castilla-Leon, Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(4):403-6.
48. Diza E, Kansouzidou A, Gerou S, Vezyri E, Metallidis S, Antoniadis A. Leishmaniasis in Northern Greece: seroprevalence of the infection and incidence of the disease during the period 2001-2006. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; 27: 997-1003.
49. Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadis G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwester Greece. *J Infect.* 2005; 50: 53-60.
50. Scarlata F, Vitale F, Saporito L, Reale S, Vecchi VL, Giordano S, Infurnari L, Occhipinti F, Titone L. Asymptomatic *Leishmania infantum/chagasi* infection in blood donors of western Sicily. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(4):394-6.
51. Vega-López F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16(2):97-101.
52. García-García JA, Martín-Sánchez J, Gállego M, Rivero-Román A, Camacho A, Riera C, Morillas-Márquez F, Vergara S, Macías J, Pineda JA. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4455-8.

53. Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol*. 1992; 51: 133-42.
54. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterisation of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47: 349-58.
55. Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarshah O and Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: A comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. *Acta Trop*. 2006; 99: 55-61.
56. Botilde Y, Laurent T, Quispe Tintaya W, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, Kuhls K, Schönian G, Dujardin JC. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infect Genet Evol*. 2006;6(6):440-6.
57. Alam MZ, Shamsuzzaman AK, Kuhls K, Schönian G. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. *Trop Med Int Health*. 2009;14(5):499-503. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02254.x.
58. Brustoloni YM, Lima RB, Venancio da Cunha R, Dorval ME, Oshiro ET, Lyrio de Oliveira AL, Pirmez C. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 497-500.
59. Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002; 96: 31-4.
60. Volpini AC, Marques MJ, Lopes dos Santos S, Machado-Coelho GL, Mayrink W, Romanha AJ. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12: 815-8.
61. Gómez-Saladín E, Doud CW, Maroli M. Short report: surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72(2):138-41.

62. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(10):e313. doi: 10.1371/journal.pntd.0000313. Epub 2008 Oct 29.
63. Gradoni L. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: operational and research challenges. *Euro Surveill*. 2013 Jul 25;18(30):20539.
64. Harms G, Schönian G, Feldmeier H. Leishmaniasis in Germany. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(7):872-5.
65. Malik AN, John L, Bruce AD, Lockwood DN. Changing pattern of visceral leishmaniasis, United Kingdom, 1985-2004. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(8):1257-9.
66. Pavli A, Maltezou HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis*. 2010;14(12):e1032-9. doi: 10.1016/j.ijid.2010.06.019.
67. Bart A, van Thiel PP, de Vries HJ, Hodiament CJ, Van Gool T. Imported leishmaniasis in the Netherlands from 2005 to 2012: epidemiology, diagnostic techniques and sequence-based species typing from 195 patients. *Euro Surveill*. 2013 25;18(30):20544
68. Antoniou M, Haralambous C, Mazeris A, Pratloug F, Dedet JP, Soteriadou K. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(2):76-7. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70004-0.
69. Siriwardana HV, Noyes HA, Beeching NJ, Chance ML, Karunaweera ND, Bates PA. *Leishmania donovani* and cutaneous leishmaniasis, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(3):476-8.
70. Elamin EM, Guizani I, Guerbouj S, Gramiccia M, El Hassan AM, Di Muccio T, Taha MA, Mukhtar MM. Identification of *Leishmania donovani* as a cause of cutaneous leishmaniasis in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(1):54-7.
71. Zivcinkjak T, Martinkovic F, Marinculic A, Mrljak V, Kučer N, Matijatko V, Mihaljevic Z, Baric-Rafaj R. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniasis among apparently healthy dog in Croatia. *Vet Parasitol*. 2005; 131: 35-43.

72. Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, de la Fuente S, Martínez AM, Pérez AM, Aránguez E, Iriso A, Sevillano O, Bernal J, Vilas F. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(30):20546.
73. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005; 35: 1169-80.
74. Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T, Orsini S, Fiorentino E, Gradoni L. The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009. *Euro Surveill.* 2013;18(29):20535.
75. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health.* 2008;13(2):256-64.
76. Fischer D, Moeller P, Thomas SM, Naucke TJ, Beierkuhnlein C. Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5: e1407.
77. Ruiz-Fons F, Ferroglio E, Gortázar C. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010. *Euro Surveill.* 2013;18(30):pii:20541.
78. Krmpotić M. Endemija kala-azara na jugoistočnoj obali Jadrana. *Lijec Vjesn* 1934; 56: 38-45.
79. Tartaglia P. Kala-azar u Dalmaciji. *Higijena* 1949; 1-3: 323-27.
80. Tartaglia P. Prilog dijagnostici Kala-Azara. *Lijec Vjesn* 1937; 59: 1-3.
81. Fališevac J, Bačun-Kubović M. Neka zapažanja u bolesnika s kala-azarom liječenih u Bolnici za zarazne bolesti u Zagrebu. *Liječ Vjes* 1973;95:122-6.
82. Mulic R, Custovic A, Ropac D, Tripkovic I, Stojanovic D, Klismanic Z. Occurrence of Visceral and cutaneous leishmaniasis in Croatia. *Mil Med.* 2009; 174: 206-11.
83. Löhr H, Wolf H. Viszerale Kala-Azar-Erkrankung beim Kind. *Dtsch med Wschr* 1978;103:424-7.

84. Rast HP, Marty HR. Kala-Azar aus Jugoslawien. Schweiz med Wschr 1986; 116:252-254.
85. Wenzl H, Petritsch W, Decrinis M, Schreiber F, Warnkross H, Pristautz H, Krejs GJ. In Kroatien erworbene Kala-Azar. Wien Klin Wochenschr. 1992;104(24):757-60.
86. Punda-Polić V, Bradarić N, Grgić D. A 9-year-old with fever and severe muscle pains. Lancet. 1997;349(9066):1666.
87. Beljan R, Sundov D, Luksić B, Soljić V, Burazer MP. Diagnosis of visceral leishmaniasis by fine needle aspiration cytology of an isolated cervical lymph node: case report. Coll Antropol. 2010;34(1):237-9.
88. Živičnjak T, Stojčević D, Marinculić A, Ramadan P, Petrinović T, Džakula N. Epizootiološka istraživanja visceralne lišmanioze u pasa i izdvajanje protozoona *Leishmania infantum*. U: Knjiga sažetaka I. hrvatskog kongresa o infektivnim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem, Dubrovnik: Hrvatski liječnički zbor; 1998, str. 106.
89. Živičnjak T, Martinković F, Khoury C, Bongiorno G, Bosnić S, Lukačević D, Maroli M. Serological and entomological studies of canine leishmaniosis in Croatia. Vet arhiv. 2011;81(1):99-110.
90. Mišćević M, Milutinović M, Ivoić V. Fauna and distribution of sandflies (Diptera, Phlebotomidae) in Yugoslavia, Croatia, Macedonia and their role in the transmission of parasitic and viral diseases. Acta Veterinaria 1998;48(2-3):163-172.
91. Bosnic S, Gradoni L, Khoury C, Maroli M. A review of leishmaniasis in Dalmatia (Croatia) and results from recent surveys on phlebotomine sandflies in three southern counties. Acta Trop. 2006; 99:42-9.
92. Farkas R, Tánzos B, Bongiorno G, Maroli M, Dereure J, Ready PD. First surveys to investigate the presence of canine leishmaniasis and its phlebotomine vectors in Hungary. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11(7):823-34. doi: 10.1089/vbz.2010.0186.
93. Tánzos B, Balogh N, Király L, Biksi I, Szeredi L, Gyurkovsky M, Scalone A, Fiorentino E, Gramiccia M, Farkas R. First record of autochthonous canine

- leishmaniasis in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012;12(7):588-94. doi: 10.1089/vbz.2011.0906.
94. Baklaić Ž, Dečković-Vukres V, Kuzman M. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2010. godinu. Web izd. HZJZ, Zagreb, 2011. str. 189-192.
 95. De Lang A, Wilander E. Sensitivity of HPV tests on stained vs. unstained cervical smears. *ActaCytol.* 2005; 49:595–599.
 96. Murase T, Inagaki H, Eimoto T. Influence of histochemical and immunohistochemical stains on polymerase chain reaction. *Mod Pathol.* 2000; 13:147–151.
 97. Kelly H, Riddell MA, Gidding HF, Nolan T, Gilbert GL. A random cluster survey and a convenience sample give comparable estimates of immunity to vaccine preventable diseases in children of school age in Victoria, Australia. *Vaccine* 2002;20(25-26):3130-6.
 98. Federico G, Damiano F, Caldarola G, Fantini C, Fiocchi V, Ortona L. A seroepidemiological survey on *Leishmania infantum* infection. *Eur J Epidemiol.* 1991;7(4):380-3.
 99. Lachaud L, Dedet JP, Marty P, Faraut F, Buffet P, Gangneux JP, Ravel C, Bastien P; Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France. Surveillance of leishmaniasis in France, 1999 to 2012. *Euro Surveill.* 2013 Jul 18;18(29):20534
 100. Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(30):20545.
 101. Gkolfinopoulou K, Bitsolas N, Patrinos S, Veneti L, Marka A, Dougas G, Pervanidou D, Detsis M, Triantafyllou E, Georgakopoulou T, Billinis C, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. Epidemiology of human leishmaniasis in Greece, 1981-2011. *Euro Surveill.* 2013;18(29):20532.
 102. Beck A, Beck R, Kusak J, Gudan A, Martinkovic F, Artukovic B, Hohsteter M, Huber D, Marinculic A, Grabarevic Z. A case of visceral leishmaniasis in a gray wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *J Wildl Dis.* 2008;44(2):451-6.

103. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671..
104. Aronson NE, Sanders JW, Moran KA. In harm's way: infections in deployed American military forces. Clin Infect Dis. 2006;43(8):1045-51.
105. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2006;44(4):1435-9.
106. Sever-Prebilić M, Prebilić I, Seili-Bekafigo I, Dokić S, Ivanis N, Nacinović-Duletić A, Vojniković B. A case of visceral leishmaniasis in the Northern Adriatic region. Coll Antropol. 2002;26(2):545-50.
107. Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. Acta Trop. 2011;119(2-3):69-75. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.05.012.
108. Poepl W, Herkner H, Tobudic S, Faas A, Auer H, Mooseder G, Burgmann H, Walochnik J. Seroprevalence and asymptomatic carriage of *Leishmania* spp. in Austria, a non-endemic European country. Clin Microbiol Infect. 2013;19(6):572-7.
109. Ferroglio E, Maroli M, Gastaldo S, Mignone W, Rossi L. Canine leishmaniasis, Italy. Emerg Infect Dis. 2005;11(10):1618-20.
110. Lima ID, Queiroz JW, Lacerda HG, Queiroz PV, Pontes NN, Barbosa JD, Martins DR, Weirather JL, Pearson RD, Wilson ME, Jeronimo SM. *Leishmania infantum chagasi* in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(1):99-107.
111. Davies CR, Mazloumi Gavgani AS. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. Parasitology. 1999;119(3):247-57
112. Caldas AJ, Costa JM, Silva AA, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96(1):21-8.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Katarina Šiško Kraljević
Datum i mjesto rođenja: 20. siječnja 1967. Split
Bračno stanje: udana; majka dvoje djece
Kućna adresa: R. Boškovića 19, 21 000 Split

Obrazovanje:

1985. / 1986.: Gaudal folkehøgskule, Trondheim, Norveška
1986. - 1992. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
1998. - 1999. Stručni poslijediplomski studij iz Medicinske mikrobiologije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2001. Specijalistički ispit iz Medicinske mikrobiologije s parazitologijom
2002. – 2003. Znanstveni poslijediplomski doktorski studij „Temeljne i kliničke medicinske znanosti, smjer Klinička medicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Zaposlenje:

1994. – 1996. liječnik opće medicine, Dom zdravlja Sinj (ambulanta opće medicine, jedinica za hitnu medicinsku pomoć, te jedinica za hemodijalizu)
1996.- 1997.: stručni suradnik, Katedra za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
1997.- 2003.: stručni suradnik, Katedra za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
2003. - 2008.: kumulativni radni odnos: 75% NZJZ; 25% MFST
od 2008.: stručni suradnik specijalist, voditelj Odjela za dijagnostiku mikoza i parazitoza, Služba za medicinsku mikrobiologiju, NZJZ Splitsko-dalmatinske županije, te vanjski suradnik i tajnik Katedre za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Znanstveno i stručno usavršavanje:

- 1998.: 6th ESCMID Postgraduate Education Course on: "Infections in Travelers", Montpellier, Francuska
- 2000.: International Advanced Study Course on Antimicrobial Resistance in Bacteria: Basis and Laboratory detection, Varšava, Poljska
- 2009.: ECSMID Postgraduate Education Course „Zoonoses and Vector-borne Diseases in Europe“, Grenoble, Francuska
2010. : sedmodnevni edukacijski boravak u Laboratoriju za dijagnostiku lišmenioze, Istituto Superiore di Sanita, kod mentorice prof. Marina Gramiccia, Rim, Italija

Znanstveni projekt:

- Od 02. 01. 2007.: Istraživač na projektu prof. dr. sc. Volge Punda-Polić: „Patogeni koje prenose člankonošci u južnoj Hrvatskoj“
(šifra projekta 216-0481153-1148).

Znanstvena i stručna područja interesa:

Dijagnostika parazitoza, osobito lišmenioze i amebijaze.

Dijagnostika mikoza, s osobitim naglaskom na dermatofitoze.

Molekularna dijagnostika zaraznih bolesti te molekularna tipizacija izolata.

Članstvo u znanstvenim i strukovnim udruženjima:

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko društvo za medicinsku mikrobiologiju Hrvatskog liječničkog zbora

Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i zarazne bolesti (ESCMID)

Radovi u međunarodnim publikacijama:

1. **Šiško-Kraljević K**, Jerončić A, Mohar B, Punda-Polić V. Asymptomatic Leishmania infantum infections in humans living in endemic and non-endemic areas of Croatia, 2007 to 2009. Euro Surveill. 2013 Jul 18;18(29):20533.

2. Punda-Polic V, Jeroncic A, Mohar B, **Sisko-Kraljevic K**. Prevalence of Toscana virus antibodies in residents of Croatia. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18;E200-E203. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03840.x
3. Bilic I, Petri NM, Krstulja M, Vuckovic M, Salamunic I, **Kraljevic KS**, Capkun V, Lusic I. Hyperbaric oxygen is effective in early stage of healing of experimental brain abscess in rats. *Neurol Res*. 2012 Dec;34(10):931-6.
4. Kovačić A, Listeš I, Vučica C, Kozačinski L, Tripković I, **Šiško-Kraljević K**. Distribution and genotypic characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry in Split and Dalmatia County, Croatia. *Zoonoses Public Health*. 2013 Jun;60(4):269-76
5. Goic-Barisic I, Towner KJ, Kovacic A, **Sisko-Kraljevic K**, Tonkic M, Novak A, Punda-Polic V. Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *J Hosp Infect* 2011; 77(4):368-0.
6. Tonkic M, Mohar B, **Sisko-Kraljević K**, Mesko-Meglic K, Goić-Barisić I, Novak A, Kovacic A, Punda-Polić V. High prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* strains in southern Croatia. *J Med Microbiol*. 2010; 59:1185-90.
7. Mulic R, **Kraljevic-Sisko K**, Tolic T, Kljajic Z, Puizina Ivic N, Ropac D. Endemo-epidemic occurrence of *Trichophyton tonsurans* in martial arts athletes in Split-Croatia. *HealthMED* 2009; 3(4):405-11.
8. Punda-Polic V, **Kraljevic KS**; Bradaric N. War-Associated Cases of Typhoid Fever Imported to Split-Dalmatia. *Military Medicine* 2007; 172. 10:1096.
9. Barišić Z, Borzić E, **Kraljević KS**, Carev M, Zoranić V, Kaliterna V. Rise in ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* from urinary tract infections from 1999-2004. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(6):550-1.