



La leishmaniose viscérale méditerranéenne : Actualités du diagnostic biologique

Mediterranean visceral leishmaniasis : update on biological diagnosis

Emna Siala¹, Aida Bouratbine¹, Karim Aoun²

1. *Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Laboratoire de recherche LR 20-IPT-06 «Parasitologie médicale, Biotechnologies et Biomolécules », Institut Pasteur de Tunis, Tunisie. Université de Tunis El Manar*
2. *Laboratoire d'Epidémiologie et d'Ecologie Parasitaires, Laboratoire de recherche LR 20-IPT-06 «Parasitologie médicale, Biotechnologies et Biomolécules », Institut Pasteur de Tunis, Tunisie. Université de Tunis El Manar.*

RÉSUMÉ

La Leishmaniose Viscérale (LV) est une parasitose sévère dont la prise en charge ne devrait pas être retardée. C'est une maladie émergente en méditerranée avec une extension des zones d'endémie et une augmentation de l'incidence des cas. Le profil des patients a aussi évolué avec davantage d'adultes touchés présentant généralement des signes cliniques peu spécifiques. D'où l'intérêt d'une confirmation biologique systématique.

La mise en évidence du parasite à l'examen direct de la moelle osseuse constitue la technique diagnostique de référence. Cependant, elle exige un prélèvement invasif. La sérologie reste contributive mais son interprétation doit toujours tenir compte du contexte épidémiologique et du tableau clinico-biologique du patient. Actuellement, le Western-Blot représente la technique sérologique la plus spécifique pour la confirmation diagnostique. Le diagnostic biologique de la LV a beaucoup bénéficié ces dernières années de l'avènement des tests de diagnostic rapides (TDR) et des techniques de biologie moléculaire. Les TDR utilisant l'antigène recombinant rk39 sont simples à réaliser et délivrent des résultats fiables en moins de 30 minutes. La PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel est actuellement retenue comme la technique de choix pour la mise en évidence de l'ADN parasitaire. Elle est associée à d'excellentes performances sur de simples prélèvements de sang évitant ainsi aux patients l'invasive ponction de moelle osseuse préalable au médullogramme. En plus, elle permet d'estimer la charge parasitaire utile au suivi post thérapeutique. Dans tous les cas, le choix des techniques à utiliser devrait être stratégique et adapté à l'épidémiologie locale ainsi qu'aux moyens disponibles.

Mots Clés : Leishmaniose viscérale, diagnostic, PCR, sérologie, test de diagnostic rapide, Tunisie.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe life threatening parasitosis requiring early management of cases. It is an emerging disease in the Mediterranean region with a spread of endemic areas and an increase in case incidence. The patient profile has also evolved with more affected adults, presenting generally non-specific symptoms. Hence the interest of a systematic biological confirmation.

The microscopic detection of *Leishmania* amastigotes in bone marrow aspirates (BMA) smears is the gold standard diagnostic technique. However, it requires invasive sampling. Serological tests searching for specific antibodies remain highly contributive, but their interpretation must always take into account the epidemiological context and the patient's clinical and biological features. Currently, the Western-Blot represents the most specific serological technique for diagnostic confirmation. VL diagnosis has greatly improved by the introduction of both rapid diagnostic tests (RDTs) and molecular biological techniques. RDTs using recombinant rk39 antigen are easy to perform and deliver results in less than 30 minutes. Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) is currently retained as the best technique for VL diagnosis. It is efficient on simple blood samples, allowing to avoid invasive BMA needed for microscopy. In addition, real-time PCR estimates parasite load which is helpful for the post-treatment follow-up. In any case, the choice of techniques to be used should be strategic and adapted to the local epidemiology as well as to the means available.

Key words: visceral leishmaniasis, diagnosis, PCR, serology, rapid diagnostic test, Tunisia.

Correspondance

Emna Siala

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie,

Laboratoire de recherche LR 0-IPT-06 « Parasitologie médicale, Biotechnologies et Biomolécules », Institut Pasteur de Tunis, Tunisie.

Université de Tunis El Manar

e-mail : emnasiala99@gmail.com

INTRODUCTION

La leishmaniose viscérale (LV) est une infection parasitaire causée par un protozoaire du complexe *Leishmania (L.) donovani*, qui comprend deux espèces majeures *L. donovani sensus stricto* et *L. infantum* (1). C'est une maladie essentiellement transmise par la piqûre d'un insecte vecteur ; le phlébotome (1). D'autres modes de contamination sont possibles tels que les échanges de seringues souillées chez les toxicomanes, les transfusions sanguines et les greffes d'organes (2–4). Les infections congénitales par transmission transplacentaire sont exceptionnelles (5). Selon l'OMS, l'incidence annuelle mondiale de la LV est estimée en 2018 entre 50 000 et 90 000 nouveaux cas qui engendrent 20 000 à 30 000 décès (6,7). La LV se présente sous deux formes nosogéographiques qui diffèrent par la nature du réservoir, les espèces de leishmanies en cause et les zones géographiques concernées :

– la LV anthroponotique appelée aussi kala-azar. Elle est due à *L. donovani* et sévit dans le sous-continent indien et en Afrique de l'Est (1).

– la LV zoonotique qui est due à *L. infantum* et dont le réservoir est le chien. Elle sévit principalement sur le pourtour du bassin méditerranéen, au moyen orient et en Amérique du Sud (1).

Dans le bassin méditerranéen, la LV a une incidence annuelle qui varie de 600 à 2000 cas selon les années (8). Son épidémiologie est marquée par certaines émergences périodiques ainsi qu'une extension des zones endémiques particulièrement en Afrique du Nord et au Sud de l'Europe (9). Cette extension serait surtout liée à des facteurs environnementaux particulièrement ceux favorables aux phlébotomes vecteurs et aux chiens réservoirs comme la mobilisation des ressources hydrauliques, l'élevage et l'agriculture (10).

La LV est fréquente au Maghreb. En Tunisie, son incidence annuelle varie de 50 à 150 cas (11). Elle est endémique surtout au nord et au centre du pays. Une extension géographique a été notée ces dernières années vers le sud du pays et serait aussi associée aux changements écologiques suscités (11–13). En Algérie, la LV est endémique dans les régions humides et sub-humides du nord avec une incidence de 100 à 200 cas annuels ; comparable à celle enregistrée en Tunisie (14). Au Maroc, La LV sévit dans certaines zones subhumides du Nord et s'étend vers le centre du pays. Son incidence moyenne est estimée à environ 100 cas par an, avec une recrudescence nette depuis les années 1990 (15–17). Il est à noter que dans les 3 pays du Maghreb, des cas plus rares sont

occasionnellement observés plus au sud dans des foyers circonscrits à certains oasis comme celles de Tozeur en Tunisie et Illizi en Algérie (11,14,18). En Afrique du Nord, la LV reste majoritairement une maladie de la petite enfance qui concerne dans environ 80% des cas des enfants de moins de 5 ans (11,18–20). Cependant, une recrudescence des cas chez les adultes a été observée depuis les années 1990 (21,22). Elle a été surtout rapportée chez des sujets présentant une immunodépression liée principalement à l'infection par le VIH et à certains traitements par les immunosuppresseurs, les corticoïdes ou les antimétabolites. Les cas de LV de l'adulte ont été également décrits chez des sujets sans facteurs d'immunodépression (21,23). Ils pourraient être en rapport avec des souches parasitaires plus virulentes ou des déficits immunitaires discrets ou non investigués. Il est à signaler que la LV à *L. infantum* est de nos jours considérée comme une parasitose opportuniste (2,3). En Europe du sud, la LV est endémique dans 8 pays (France, Espagne, Portugal, Italie, Albanie, Chypre, Grèce et Malte) (9,24). En France, la LV autochtone se transmet sur la Côte d'Azur, en Provence, dans les Cévennes, dans les Pyrénées Orientales et en Corse (24,25). Le nombre moyen de cas de LV autochtones enregistrés au centre national de référence des leishmanioses a été de 22,6 cas annuel entre 1999 et 2012 (26). Les autres pays de la rive nord méditerranéenne comme l'Italie, l'Espagne et l'Albanie rapportent plus de 100 cas de LV par an (27,28). Une épidémie a été même observée dans la banlieue sud de Madrid entre 2009 et 2012 avec 446 cas enregistrés (29,30). Il est à noter que dans les pays du sud-ouest de l'Europe (Portugal, Espagne, France, Italie), les cas d'adultes sont majoritaires avec plus de 50% d'entre eux co-infectés par le VIH (30). Les cas d'adultes sans facteurs d'immunodépression ne sont pas exceptionnels et sont de plus en plus rencontrés. A titre d'exemple, lors de l'épidémie récente de la LV de Madrid, près de 70% des cas ont été diagnostiqués chez des adultes immunocompétents (29).

En zone endémique, la LV doit être suspectée devant tout contexte évocateur. C'est une infection grave et fatale en l'absence de traitement. Son diagnostic doit être fiable et rapide.

L'objectif de cette mise au point est d'une part de rappeler les données épidémiologiques et clinico-biologiques évocatrices de la LV et d'autre part de passer en revue les techniques actuelles de son diagnostic biologique en précisant leurs performances, leurs avantages et leurs limites et de conclure en recommandant une stratégie de leur utilisation selon les contextes épidémiocliniques.

SIGNES CLINIQUES

Les manifestations cliniques de l'infection par *L. infantum* sont très variables et polymorphes. Elles vont du portage asymptomatique assez fréquent à la maladie polysymptomatique potentiellement mortelle (1,30–32). L'expression clinique dépend d'une part de l'hôte infecté; principalement de l'âge, de l'état immunitaire, de la prédisposition génétique, d'une éventuelle malnutrition, etc et d'autre part de la virulence de la souche en cause et de la quantité de parasites infectants inoculés (33). Les constituants de la salive du phlébotome pourraient également intervenir d'après certaines données récentes (34). La LV méditerranéenne atteint souvent les enfants avec des signes cliniques évocateurs. Les formes observées chez l'adulte sont plus rares et s'associent à des manifestations cliniques moins caractéristiques, expliquant les difficultés diagnostiques.

- La forme clinique type de l'enfant se caractérise par une triade classique comprenant une fièvre irrégulière décrite comme folle évoluant pendant plusieurs semaines voir des mois, une pâleur témoin de l'anémie et une splénomégalie lisse ferme et indolore pouvant dépasser l'ombilic (35). Les adénopathies sont rares mais peuvent être isolées (36). À ces signes s'associe le plus souvent une altération de l'état général avec une perte de poids. Une hépatomégalie peut être notée dans plus de la moitié des cas témoignant souvent d'une forme évoluée (37). Sous les climats tempérés comme celui du bassin méditerranéen, les signes cliniques peuvent avoir un caractère saisonnier avec un début plutôt hivernal, soit après une incubation silencieuse de quelques semaines à quelques mois après la pique infectante souvent estivale des phlébotomes (11,13,18). Cette période d'incubation est cependant plus variable et moins marquée qu'au cours de la leishmaniose cutanée (LC) faisant que contrairement à cette dernière forme, les cas de LV sont observés sur tous les mois de l'année (11,38).

- Chez l'adulte, le tableau clinique est souvent incomplet et moins bruyant. En effet, l'infection est généralement pauci-symptomatique. Les atteintes bronchiques, digestives ou tégumentaires sont plus fréquentes (22,39). Dans la moitié de ces cas, on retrouve une immunodépression telle qu'une co-infection avec le VIH avec un taux de lymphocytes CD4 inférieur à 200/mm³ ou une thérapie immunosuppressive (2,10). Dans les pays d'endémie comme le notre, il faut toujours évoquer la LV devant une fièvre au long cours ou une splénomégalie isolée non étiquetées.

SIGNES BIOLOGIQUES NON SPECIFIQUES D'ORIENTATION

Le tableau biologique associe habituellement une pancytopénie, un syndrome inflammatoire et une dysprotéïnémie. L'anémie est quasi constante (30,40). Elle est normochrome, normocytaire et arégénérative et s'aggrave progressivement au cours de l'évolution. La neutropénie est fréquente et parfois importante avec une agranulocytose aiguë. L'absence d'hyperleucocytose dans un contexte infectieux est évocatrice. La thrombopénie reste longtemps modérée mais peut s'aggraver (10). Le syndrome inflammatoire est marqué par une vitesse de sédimentation globulaire très accélérée atteignant en général 50 à 100 mm à la première heure et une CRP très augmentée (20). La protidémie totale peut être normale, diminuée ou élevée avec un rapport albumine/globuline souvent inférieur à un. L'électrophorèse des protéides met en évidence une hypoalbuminémie et une hypergammaglobulinémie polyclonale très suspecte touchant surtout les IgG (1).

En l'absence de traitement, la LV peut s'aggraver progressivement et entraîner la mort par des complications principalement hémorragiques et/ou infectieuses (1,30). Son pronostic dépend de la précocité du diagnostic et de la prise en charge thérapeutique. D'où l'intérêt de penser au diagnostic devant un contexte évocateur et surtout utiliser les techniques biologiques performantes et rapides pour le confirmer.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE SPECIFIQUE

De très nombreux outils sont actuellement disponibles pour confirmer le diagnostic de la LV. Leur accessibilité, leurs performances, leur coût et leur rapidité d'exécution sont très variables. Ils sont groupés en 3 grandes classes selon la preuve d'infection parasitaire qu'ils cherchent: l'observation du parasite, la détection des anticorps spécifiques et la mise en évidence de l'ADN parasitaire.

I. Diagnostic parasitologique

Il repose sur la mise en évidence des leishmanies apportant ainsi un diagnostic de certitude de la LV.

1. Examen microscopique direct : classiquement la recherche du parasite nécessite un prélèvement de moelle osseuse (MO) réalisé par ponction sternale chez l'adulte et par ponction de la crête iliaque chez l'enfant. La ponction de MO reste un geste invasif, douloureux et

souvent traumatisant pour le patient. Lorsqu'il est réalisé, il doit être réussi afin de ramener le matériel médullaire utile et ainsi optimiser les chances de mise en évidence des leishmanies. D'autres prélèvements ; du foie, des ganglions lymphatiques, des muqueuses digestives ou des lavages broncho-alvéolaires peuvent être effectués en fonction des manifestations cliniques (39,41). Il est à noter que la ponction splénique constitue un prélèvement de choix crédité de la meilleure sensibilité (93%-99%) (42,43). Néanmoins, elle présente un risque hémorragique important à cause de la thrombopénie souvent associée et devrait être évitée autant que possible (44). L'examen direct des frottis de MO après coloration au May-Grünwald-Giemsa ou au Giemsa ou ses dérivés (RAL555®) montre les formes amastigotes; souvent en extracellulaire et/ou typiquement en intracellulaires dans les cellules phagocytaires (20,30). Elles sont ovales ou arrondies de 2 à 5 µm de diamètre et renferment un noyau et un kinétoplaste punctiforme ou de forme allongée. Le cytoplasme est coloré en bleu pâle, alors que le noyau et le kinétoplaste sont colorés en rouge pourpre (figure 1) (10).

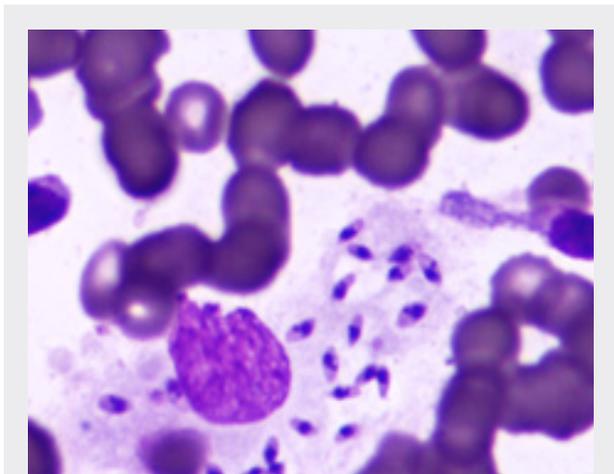


Figure 1. Amastigotes de leishmanies en intra-macrophagique au myélogramme (X100).

L'examen microscopique de la MO est une méthode de base du diagnostic de la LV (45,46). Il est avantageux grâce à son coût faible et son résultat rapide. Cependant, la lecture des frottis nécessite un biologiste expérimenté. Les faux négatifs ne sont pas exceptionnels et s'observent en cas de faible charge parasitaire ou de ponction hémodiluée. La sensibilité du médullogramme varie entre 53% et 86% selon les séries (44,47,48).

Ces dernières années, la recherche de leishmanies au niveau du sang périphérique, après leuco-cyto-centrifugation a été utilisée par plusieurs équipes (49–51). Elle est recommandée chez les sujets immunodéprimés, en raison du caractère peu invasif du prélèvement sanguin comparativement à la ponction médullaire et des parasitémiés relativement élevées en cas d'immunodépression.

2. Culture : la mise en culture de la MO sur milieux spécifiques permet l'obtention de formes promastigotes de leishmanies de 10 à 15 µm de long sur 1 à 3 µm de large, flagellées et mobiles. Le milieu Novy, Mc Neal et Nicolle est le plus utilisé en pratique courante (52,53). C'est un milieu facile à préparer et peu coûteux. Il est constitué d'une gélose enrichie de sang de lapin et additionnée d'antibiotiques et d'antifongiques pour inhiber la prolifération des bactéries et des moisissures. D'autres milieux de culture peuvent être utilisés tels que le milieu de sérum de lapin coagulé, le milieu RPMI et le milieu de Sloppy-Evans (52). Cependant, ces derniers sont plus difficiles à préparer et sont plus coûteux. La culture présente l'avantage de rattraper certains examens directs négatifs (30,53). Elle permet également d'isoler les souches et ainsi les identifier par typage isoenzymatique (54,55). Elle permet également dans certains cas l'évaluation de leur sensibilité aux anti-leishmaniens (56). Néanmoins, le principal inconvénient de la culture est son incubation d'un minimum d'une semaine jusqu'à un mois. De tels délais sont longs pour une maladie grave nécessitant une prise en charge rapide voir urgente. Selon les études, les sensibilités rapportées des myélocultures varient de 60% à 100% (52,57). Les faux négatifs sont observés en cas de faible charge parasitaire ou de difficulté de pousse de certaines souches de leishmanies dont celles de *L. infantum* (48). De même, les cultures peuvent être confrontées aux problèmes de contaminations; diminuant ainsi leurs sensibilités (52). Ces 25 dernières années, l'isolement des leishmanies en culture a été efficacement réalisé à partir du sang périphérique (52,58). Plusieurs études ont ainsi montré que les sensibilités de mises en cultures de la couche leucocytaire sanguine et de la MO sont comparables chez les sujets immunocompétents (47,52). Les faux négatifs sont observés en cas de très faible parasitémie ou de quantité insuffisante du sang prélevé.

La mise en culture du sang représente une option intéressante dans le diagnostic de la LV. Cependant, les longs délais d'incubation et la nécessité de disposer d'une animalerie ont réduit son usage en pratique courante ; la laissant l'apanage des laboratoires spécialisés et des centres de recherche.

3. Autres méthodes : d'autres techniques de mise en évidence de leishmanies sont décrites telles que le xénodiagnostic et l'inoculation à l'animal, particulièrement le hamster pour *L. infantum*. Elles sont cependant peu employées dans le cadre du diagnostic puisqu'elles sont longues, modérément sensibles et exigent un élevage de phlébotome ou une animalerie (59).

II. Diagnostic immunologique

Il se base principalement sur la mise en évidence des anticorps spécifiques *anti-Leishmania* dans le sérum ou le plasma.

1. Mise en évidence des anticorps spécifiques : plusieurs techniques immunologiques sont utilisées pour le diagnostic des LV. Elles se pratiquent sur des prélèvements de sang et sont donc moins invasives que la ponction de MO. Elles détectent des anticorps spécifiques qui sont de très haute valeur diagnostique.

*L'immunofluorescence indirecte (IFI) : elle est considérée comme la technique sérologique de référence (25,59). Sa sensibilité et sa spécificité rapportées varient respectivement de 87 à 100% et de 77 à 100% (46,60). Néanmoins, malgré ces bonnes performances, le résultat de l'IFI demeure étroitement lié à l'expérience du microscopiste. De plus, elle exige un microscope à fluorescence de coût élevé pas toujours disponible.

* L'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay): c'est une technique immunoenzymatique qui est progressivement en train de supplanter l'IFI en pratique courante. Elle peut être automatisable et offre la possibilité de tester de nombreux prélèvements en série sur une même plaque. Cependant, ses sensibilités et spécificités dépendent étroitement de l'antigène employé (47,61). Les kits utilisant le peptide recombinant K39 (rK39) ont d'excellentes spécificités estimées de 93% à 100% (62–64). Un test ELISA développé récemment et basé sur la détection d'anticorps contre la protéine de fusion rk28 a montré une sensibilité et une spécificité très prometteuses de 99,6 (IC 95%, 0.97–0.99) et de 94,1-100% respectivement (65). Par ailleurs, des tests ELISA détectant les IgE anti-leishmaniens ont été également utilisés pour le diagnostic. En plus de leur sensibilité élevée, ils ont montré un intérêt dans le suivi post-thérapeutique puisque leur négativité est en faveur d'une bonne réponse (66).

L'IFI et l'ELISA sont des techniques quantitatives employées couramment en diagnostic de routine. Les résultats montrant des titres élevés d'anticorps sont en faveur du diagnostic de la LV. Cependant, l'interprétation des titres faibles d'anticorps est délicate particulièrement

en zones d'endémie des LV et des LC, comme le Maghreb où des sujets tout venant peuvent présenter pareils titres sans que ce ne soit associé à une vraie LV (67). D'autre part, ces techniques sont parfois prises en défaut dans certaines immunodépressions, dont l'infection par le VIH, révélant ainsi des résultats faussement négatifs (68).

* L'hémagglutination indirecte et l'électrosynérèse : elles sont rarement employées pour le diagnostic des LV à cause d'un manque de sensibilité et de spécificité lié aux antigènes utilisés (45,59).

* L'immunoempreinte ou western blot (WB) : elle représente une technique sérologique de choix pour confirmer le diagnostic d'une LV à *L. infantum* en mettant en évidence deux bandes spécifiques 12/14 et/ou 16 kDa (66). En plus de sa spécificité, plusieurs études ont montré que la sensibilité du WB était supérieure à celle des techniques de sérologiques conventionnelles et approche 100% chez l'immunocompétent (70,71). En outre, ce test permet aussi de différencier les sujets malades de ceux porteurs asymptomatiques. En effet, selon certains auteurs, la présence simultanée des bandes 14 kDa et/ou 16 kDa avec des bandes comprises entre 18 et 33 kDa serait plutôt spécifique de la LV maladie (70,72). Malgré le coût élevé des Kits commercialisés, leurs bonnes performances justifient leur utilisation en tant que techniques de confirmation dans les laboratoires spécialisés et ce particulièrement dans certaines situations comme chez les sujets immunodéprimés dont les titres d'anticorps sont parfois très faibles. En effet, chez les patients co-infectés par le VIH, la méta-analyse de Cota et al a montré des sensibilités supérieures du WB (84%) par rapport à l'ELISA (66%) et l'IFI (51%). Les spécificités de ces différentes techniques étaient respectivement de 82%, 90% et 93% (73).

*Les tests d'agglutination directe DAT (Direct Agglutination Test): développés à la fin des années 1990, ils sont basés sur la détection semi-quantitative des anticorps spécifiques en utilisant des leishmanies formolés. Ils sont peu coûteux, de lecture simple et bien adaptés aux conditions des structures sanitaires des zones rurales et périphériques, d'où sont originaires la majorité des cas de LV (46,74). Néanmoins, ils nécessitent plusieurs dilutions, une incubation assez longue de 12 à 18 heures et des conditions minimales de conservation de l'antigène. La méta-analyse de Chappuis incluant 30 études estimait une sensibilité et une spécificité des DAT élevées de 94,8% (IC 95%, 92,7–96,4) et de 85,9% (IC 95%, 72,3– 93,4) respectivement (75). L'étude récente de Bangert en 2018 utilisant le test DAT (ITM-DAT/VL, Belgium) rapporte une sensibilité de 84% et une spécificité de 86% (76). Il faut toutefois signaler que les valeurs prédictives des DAT sont variables et sont étroitement liées à la

prévalence de l'infection et au contexte épidémiologique (25,45). En effet, ces tests peuvent être « faussement positifs » en cas de portage asymptomatique du parasite ou d'une infection ancienne (45,77). De même, des réactions croisées ont été observées en cas d'autres infections tels que le paludisme, la maladie de chagas et la brucellose (45,77). Par conséquent, l'utilisation des DAT reste limitée en pratique courante. La méta-analyse de Maia et al suggère leur utilisation lorsque d'autres techniques de confirmation ; particulièrement celles de mise en évidence du parasite ne sont pas disponibles (78). Un nouveau test d'agglutination rapide (FAST) adapté au dépistage de masse et permettant un résultat rapide en moins de trois heures a été testé en Iran. Sa sensibilité et sa spécificité étaient respectivement de 95,4% et 88,5% en comparaison avec le DAT classique (79). Chez les patients co-infectés par le VIH, la méta-analyse de Cota et al rapporte une meilleure sensibilité des DAT (81%) par rapport à l'ELISA (66%) et l'IFI (51%) ainsi qu'une bonne spécificité de 90% (73).

* Les tests de diagnostic rapide (TDR) : Ils ont été développés plus récemment pour la détection des anticorps *anti-Leishmania* dans le sérum, le plasma ou le sang total et sont en train de révolutionner le diagnostic et la prise en charge (PEC) de la LV. Ils reposent sur le principe de l'immunochromatographie en utilisant des bandelettes sensibilisées par un antigène recombinant tels que le rK39, le rK9, le rKE16, le rK26 et le rK28 (65,80,81).

Les TDR utilisant le rK39 ont montré les meilleurs sensibilités et spécificités et sont actuellement les plus utilisés (figure 2) (63,75).

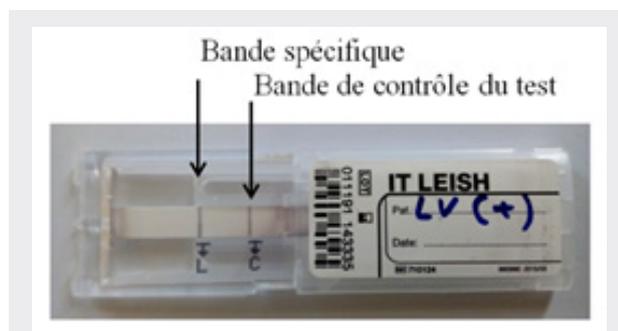


Figure 2. Test rapide de leishmaniose IT-LEISH® positif.

Néanmoins, les performances diagnostiques des tests commercialisés sont très variables et dépendent des variations régionales de l'expression de l'antigène rK39 au niveau des souches circulantes (75,82–84). Actuellement, parmi les TDR basés sur le rK39, le Kalazar Detect® (Inbios International, USA) et le IT-LEISH® (BioRad,

France) sont les tests les plus validés (85). Dans une évaluation menée par l'OMS en 2012, les sensibilités du test DiaMed IT-LEISH® (Biorad, France) ont été de 87,2% en Afrique de l'Est, de 92% au Brésil et de 98,8% sur le sous-continent indien. Les spécificités étaient de 96,4% en Afrique de l'est, de 95,6% au Brésil et de 97,6% en Inde (86). De même, une revue systématique récente, montre une sensibilité du TDR rK39 dans le sous-continent indien et au Brésil estimée à 97% et 88-94% respectivement, tandis qu'elle était plus faible en Afrique de l'Est (85%), alors que les spécificités étaient toujours supérieures à 90% (87). En France, Marty et al rapportent une sensibilité et une spécificité du test DiaMed IT-LEISH® (Biorad, France) respectivement de 97% et 98% (25). En Espagne, l'étude de Bangert et al rapporte 83% de sensibilité et 100% de spécificité pour le Kalazar Detect® avec des valeurs prédictive positive (VPP) et négative (VPN) respectives de 100% et de 93,6% (76). En Tunisie, l'évaluation du test Kalazar Detect® sur une série de 574 cas de LV trouve une sensibilité de 87,1% et une spécificité de 94,4% (67). En 2015, l'évaluation d'un nouveau TDR basé sur la protéine recombinante rK28 a montré une sensibilité supérieure à 95% en Inde et en Afrique de l'Est (88). Un autre test de détection rapide (TRALd®) (InBios International, USA) utilisant le rK39 et le rK26 a montré une sensibilité et une spécificité élevées respectivement de 100% et de 98% (89).

Les TDR ont révolutionné la prise en charge de la LV en raccourcissant le délai diagnostique avec un résultat rapide en 10 à 20 mn. Ils ne nécessitent pas d'équipements ou de réactifs spécifiques, ni de modalités de transport et de conservation exigeantes et sont simples à réaliser par un personnel n'ayant pas nécessairement une expertise sur le sujet. Actuellement, les TDR sont fortement recommandés par l'OMS en cas de suspicion de LV particulièrement en zones d'endémie de la maladie et en l'absence d'autres techniques de confirmation du diagnostic (7). En Tunisie, ils ont été introduits en routine ces dernières années, permettant ainsi d'accélérer la démarche diagnostique particulièrement dans les laboratoires non spécialisés dont ceux des hôpitaux régionaux (circulaire 19/2018, Ministère de la Santé, Tunisie). Ceci permet l'instauration rapide du traitement et l'amélioration du pronostic de la maladie. Par ailleurs, il faut signaler que chez les sujets immunodéprimés, principalement ceux co-infectés par le VIH, les TDR sont moins sensibles (90). En effet, la sensibilité du test IT-LEISH® n'était que de 54% (avec une

spécificité de 98%) dans l'étude de Marty concernant des sujets séropositifs pour le VIH (25). De même, Bangert rapporte chez une population comparable une sensibilité de 67,3% avec une spécificité de 100% pour le test Kalazar Detect®. La VPP était de 100%, alors que la VPN n'était que de 66,7% (76). Par conséquent, en cas de TDR négatif chez les patients immunodéprimés, il est recommandé de compléter par une PCR, un médullogramme ou un WB.

Les faux positifs des TDR ont été fréquemment observés chez les porteurs asymptomatiques vivant dans les zones endémiques (91–93). De même les TDR peuvent être positifs chez certains sujets atteints de LC qui synthétisent et gardent des taux faibles d'anticorps spécifiques *anti-Leishmania* (67,94,95). Cette positivité est liée à des communautés antigénique entre les différentes espèces en cause. Par conséquent, en Tunisie et dans les autres pays où coexistent la LC et La LV, l'interprétation de ces tests doit tenir compte des antécédents du patient et de son origine géographique. Les réactions croisées ont été également observés en cas de paludisme, de fièvre typhoïde, de trypanosomose et de tuberculose (91,96). Dans tous les cas, l'interprétation des résultats des TDR et leur confirmation éventuelle par des tests plus spécifiques (médullogramme ou PCR) doivent prendre en compte le contexte épidémiologique, les signes clinico-biologiques et la disponibilité des autres techniques du diagnostic biologique.

La détection des anticorps sériques *anti-Leishmania* demeure très utile dans le diagnostic de la LV. Elle l'est encore davantage quand la recherche du parasite est négative ou ne peut être réalisée. En effet, une sérologie positive de la leishmaniose permet une très forte présomption du diagnostic devant des signes cliniques et des anomalies biologiques évocateurs (25). Les présomptions tendent vers les certitudes lorsque les titres d'anticorps sont significatifs avec les techniques quantitatives. Néanmoins, chez les sujets immunodéprimés, la majorité des techniques sérologiques manquent de sensibilité car les anticorps sont souvent à des titres faibles voire absents (2,47). Les faux positifs du sérodiagnostic sont rencontrés suite à des réactions croisées chez des patients atteints de paludisme, de trypanosomose, de tuberculose, d'une connectivité ou de syndromes myéloprolifératifs (48,59). Par ailleurs, la sérologie peut être positive en cas de portage asymptomatique posant ainsi un problème diagnostique dans les zones d'endémie (97,98). En conséquence, l'interprétation des résultats sérologiques doit toujours tenir compte du contexte épidémiologique et du tableau

clinico-biologique du patient. Il est également important de signaler que la sérologie n'est pas indiquée dans le suivi post-thérapeutique puisque les anticorps persistent à des titres élevés plusieurs mois après la guérison (20,99).

2. Mise en évidence des antigènes parasitaires : plusieurs tests d'agglutination indirecte recherchant les antigènes circulants dans les urines ont été mis au point (46,100). Leurs performances varient selon les études et montrent une sensibilité très variable de 47 à 95% avec une bonne spécificité de 82 à 100% (48,100,101). La méta-analyse de Cochrane en 2014 incluant six études et évaluant le test KAtex® (Kalon Biological, United Kingdom) rapporte une spécificité élevée de 92,9% (IC 95%, 76,7%-99,2%) et une sensibilité relativement faible de 63,6% (IC 95%, 40,9%-85,6%) (87). Plus récemment, Ghosh et al ont rapporté l'intérêt d'un nouveau kit ELISA détectant l'Ag recombinant rK28 dans les urines avec une sensibilité de 95,4% et une bonne spécificité de 96,3% (102). Les bonnes spécificités des tests détectant des antigènes parasitaires soulignent leur utilité en cas de positivité surtout qu'ils sont rapides, simples à exécuter et que les urines sont faciles à obtenir. Ils sont également adaptés au suivi des patients traités puisqu'ils se négativent un à six mois après un traitement efficace (103). Ils sont non exigeants en équipement et en matériel, ce qui privilégie leur utilisation sur le terrain. Toutefois, leur indication reste limitée en pratique courante à cause de leur faible VPN et des faux positifs possibles en cas de portage asymptomatique (104,105). Ils seraient plus intéressants chez les patients immunodéprimés co-infectés par le VIH dont les titres en anticorps peuvent être faibles et chez lesquels les performances sont meilleures avec une sensibilité de 85 à 100% et une spécificité de 96 à 100% (103,106).

III. Diagnostic moléculaire

La détection de l'ADN de leishmanies par amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction) est de nos jours la méthode la plus utilisée à travers le monde pour le diagnostic de la LV (107–109). Elle peut être réalisée sur divers prélèvements biologiques principalement les ponctions de la MO, du foie ou des ganglions. Il est également possible de la pratiquer sur des biopsies tissulaires d'organes potentiellement touchés. Le plus indéniable de la PCR au cours de la LV reste ses très bonnes performances sur les échantillons de sang qui sont même rapportées comme comparables à celles avec la MO (47,97). Par conséquent, la recherche d'ADN parasitaire dans du sang périphérique, facilement

recueilli sur un anticoagulant (EDTA), a désormais permis de supplanter l'invasive ponction médullaire dans le diagnostic de la LV. Les cibles d'amplification les plus fréquemment utilisées correspondent à de l'ADN kinétoplastique, l'ADN ribosomique 18S et le gène codant pour l'ARN polymérase II (47). La méta-analyse de Ruiter et al. incluant 19 études ayant utilisé les prélèvements sanguins rapporte une sensibilité et une spécificité de la PCR de 93,1% (95% IC, 90,0-95,2) et de 95,6% (95% IC, 87,0-98,6) respectivement (97). Il faut toutefois signaler que dans ces études l'analyse des performances des PCR en question n'a pas pris en considération la détection du portage asymptomatique fréquent en zone d'endémie ainsi que les vraies infections non détectées par l'examen microscopique, la culture et/ou la sérologie préalablement adoptées comme techniques de référence. Les performances de la PCR seraient donc probablement meilleures que celles rapportées dans ces études. L'apport des techniques PCR est encore plus important chez les patients immunodéprimés en raison des plus fortes charges parasitaires (CP). En effet, la méta-analyse de Cota et al regroupant 33 études montre que ces techniques sont les plus performantes au cours de la LV chez les patients co-infectés par le VIH, avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 96% (73).

Parmi les différentes variantes de PCR disponibles, la PCR quantitative en temps réel ressort actuellement comme celle de choix dans le diagnostic de la LV (figure 3) (107,110,111). C'est la méthode la plus sensible. Elle peut détecter des parasitémies inférieures à un parasite/microlitre de sang en ciblant l'ADN kinétoplastique dont le nombre de copies peut aller jusqu'à 10 000 par parasite (110,111). La PCR en temps réel présente également l'avantage d'un diagnostic rapide en rendant un résultat en quelques heures. De plus, elle est réalisée en système fermé ce qui réduit les risques de contaminations (110). En plus de son apport diagnostique, la PCR quantitative évalue la CP d'où son intérêt dans l'évaluation et le suivi de la réponse au traitement des patients (111,112). Elle permet de détecter précocement les résistances aux traitements et les fréquentes rechutes et récidives chez les immunodéprimés améliorant ainsi sensiblement la PEC de ces patients (90). Grâce à l'estimation de la CP, elle aide également à faire la part dans certaines situations entre le portage asymptomatique et la maladie active (111,113). Les sensibilités de cette technique pour les prélèvements médullaires et sanguins sont proches de

100% avec des spécificités excellentes (30). Selon l'étude de Aissi et al concernant 240 cas de LV diagnostiqués en Tunisie, la PCR en temps réel était la technique la plus sensible (100%) suivie de la sérologie par ELISA (95%), de l'examen direct du myélogramme (82,8%) et enfin de la culture du sang sur milieu NNN (69,3%) (40).

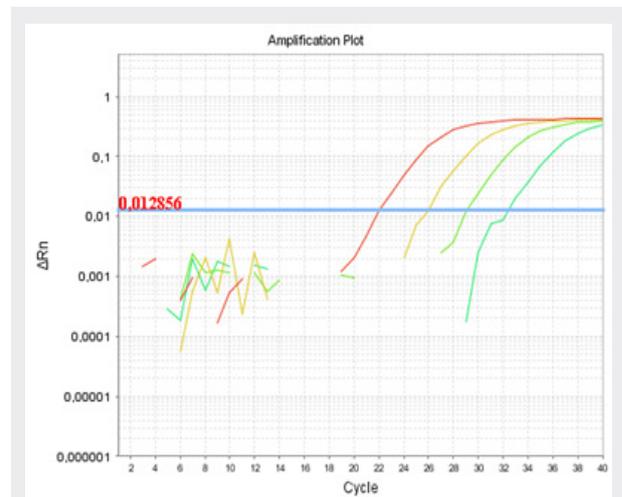


Figure 3. Courbes d'amplifications d'une PCR en temps réel TaqMan de dilutions en série d'ADN de *Leishmania infantum*.

La limite des techniques PCR en temps réel est l'exigence d'appareils assez coûteux pas toujours disponibles dans les structures sanitaires des pays en voie de développement. L'alternative des PCR classiques en point final dont les thermocycleurs sont plus accessibles reste fort utile malgré les résultats plus tardifs liés à l'étape de migration des amplifiats sur gel et à l'absence de quantification de la charge parasitaire. Plus récemment, la technique LAMP à amplification isotherme de l'ADN et à révélation plus simple semble prometteuse. En effet, elle est nettement moins exigeante en équipements et peut s'adapter aux structures sanitaires périphériques (114,115).

En dépit de son coût plus élevé, le diagnostic moléculaire de la LV est devenu incontournable pour la confirmation diagnostique et le suivi des malades. Les techniques de biologie moléculaire sont également utiles à l'identification des espèces de *Leishmania* en cause chez les patients. La PCR-RFLP (Restriction fragment length polymerase) ciblant le gène ribosomal ITS1 (internal transcribed spacer) (116), la PCR utilisant des températures de fusion (HRM) et le séquençage de plusieurs gènes discriminatifs sont les plus utilisés pour cet objectif (107,116,117). Cependant, l'identification d'espèce est moins intéressante et contributive au cours de la LV. En effet, la majorité des foyers mondiaux de la maladie n'impliquent qu'une seule espèce à la fois à savoir L.

donovani dans le sous continent indien et *L. infantum* en Amérique du sud, en méditerrané et au moyen orient. Ces identifications ne seraient utiles que dans certaines régions d'Afrique de l'Est où des cas d'infection à *L. infantum* sont rapportés à côté d'une majorité à *L. donovani* (118). Dans tous les cas, l'identification d'espèce impacte peu la PEC au cours de la LV vu la rareté des options thérapeutiques disponibles et l'absence d'indications strictes dépendant des espèces en cause.

STRATEGIES DIAGNOSTIQUES

La confirmation biologique du diagnostic de la LV est incontournable en raison des lourdes implications qui en découlent en termes de PEC hospitalière et de traitements. Elle s'est pendant longtemps reposée sur la mise en évidence des leishmanies sur le médullogramme qui impose malheureusement des prélèvements invasifs. Des techniques récentes performantes offrent des alternatives intéressantes. Ces techniques doivent de nos jours être privilégiées en priorité. Les choix dépendront des moyens et méthodes disponibles ainsi que du contexte clinico-épidémiologique. Malgré son coût et ses exigences, la PCR en temps réel est à privilégier en cas d'accessibilité à des laboratoires spécialisés. En effet, elle est la plus sensible, se pratique sur de simples prélèvements de sang et permet le suivi post-thérapeutique des patients. En cas de non disponibilité de la PCR avec une forte préemption, le diagnostic de la LV peut être retenu grâce aux autres tests biologiques. Ainsi un test sérologique quantitatif (ELISA, IFI) exprimant un titre élevé d'anticorps spécifiques, voir un TDR positif, chez un enfant vivant en zone d'endémie et présentant les signes cliniques caractéristiques pourrait faire retenir le diagnostic et démarrer le traitement. La pratique des TDR est actuellement fortement recommandée et gagnerait à être diffusée vu leur simplicité et leur rapidité. D'ailleurs, la nouvelle stratégie nationale soutenue par l'OMS et basée sur un dépistage régional par les TDR a permis de réduire les délais de diagnostic de la maladie et d'en améliorer sensiblement le pronostic. Une confirmation ultérieure dans des centres spécialisés par la PCR serait souhaitable et utile entre autre pour la surveillance post thérapeutique. Le WB, voir la recherche d'antigènes parasitaires, sont intéressants chez les sujets immunodéprimés dont les tests sérologiques classiques se sont révélés négatifs.

Chez l'adulte, les formes atypiques et les localisations inhabituelles peuvent égarer le diagnostic. La recherche du parasite peut s'effectuer dans les biopsies digestives,

les biopsies ganglionnaires ainsi que les lavages broncho-alvéolaires selon les signes cliniques. Enfin et au-delà des malades suspects de LV, le dépistage sérologique d'une infection asymptomatique par *L. infantum*, pourrait stratégiquement être discutée à titre préventif, en cas de transplantation d'organes ou de don de sang particulièrement lorsque les poches de sang en question sont destinées à des patients immunodéprimés. Il est à signaler que le risque de transmission des leishmanies par transfusion sanguine a nettement diminué grâce à la déleucocytation des culots de globules rouges.

CONCLUSION

L'avènement des techniques PCR et des TDR a beaucoup amélioré le diagnostic et la PEC de la LV. Le choix des techniques à engager est stratégique et dépend de l'épidémiologie de la maladie et des moyens économiques et logistiques disponibles.

Conflits d'intérêt : Aucun

RÉFÉRENCES

1. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Lancet Lond Engl 2018;392(10151):951-70.
2. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet J-P, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol Rev 2008;21(2):334-59.
3. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. Lancet Infect Dis 2008;8(3):191-9.
4. Cruz I, Morales M, Noguera I, Rodríguez-Arenas MÁ, Alvar J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. Lancet 2002;359:1124-5.
5. Pagliano P, Carannante N, Rossi M, Gramiccia M, Gradoni L, Faella FS, et al. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. J Antimicrob Chemother 2005;55(2):229-33.
6. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries 2015;9(6):588-96.
7. Organisation Mondiale de la Santé. Principaux repères sur la leishmaniose [En ligne]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
8. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser. 2010;(949):xii-xiii, 1-186.
9. Gangneux J-P, Belaz S, Robert-Gangneux F. Mise au point

- et actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. *J Anti-Infect* 2015;17(1):25-8.
10. Faucher B, Piarroux R. Visceral leishmaniasis: an update. *Rev Med Interne* 2011;32(9):544-51.
 11. Aoun K, Jeddi F, Amri F, Ghrab J, Bouratbine A. Current epidemiological data on visceral leishmaniasis in Tunisia. *Med Mal Infect* 2009;39(10):775-9.
 12. Ben Salah AB, Ben Ismail R, Amri F, Chlif S, Ben Rzig F, Kharrat H, et al. Investigation of the spread of human visceral leishmaniasis in central Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94(4):382-6.
 13. Benabid M, Ghrab J, Rhim A, Ben-Romdhane R, Aoun K, Bouratbine A. Temporal dynamics and *Leishmania infantum* infection prevalence of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Phlebotominae) in highly endemic areas of visceral leishmaniasis in Tunisia. *PLoS One* 2017;12(9):e0184700.
 14. Adel A, Boughoufalah A, Saegerman C, De Deken R, Bouchene Z, Soukehal A, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: an update. *PLoS One* 2014;9(6):e99207.
 15. Kahime K, Boussaa S, Nhammi H, Boumezzough A. Urbanization of human visceral leishmaniasis in Morocco. *Parasite Epidemiol Control* 2017;2(4):1-6.
 16. Kholoud K, Bounoua L, Sereno D, El Hidan M, Messouli M. Emerging and Re-Emerging Leishmaniases in the Mediterranean Area: What Can Be Learned from a Retrospective Review Analysis of the Situation in Morocco during 1990 to 2010? *Microorganisms* 2020;8(10):E1511.
 17. Mniouil M, Fellah H, Amarir F, Et-Touys A, Bekhti K, Adlaoui EB, et al. Epidemiological characteristics of visceral leishmaniasis in Morocco (1990-2014): an update. *Acta Trop* 2017;170:169-77.
 18. Bouratbine A, Aoun K, Chahed MK, Ben Ismail R. Données épidémiologiques sur la leishmaniose viscérale infantile en Tunisie en 1993. *Med Mal Infect* 1998;28(5):446-7.
 19. Harrat Z, Addadi K, Belkaid M, Tabet-Derraz O. Visceral leishmaniasis in Algeria. Cases reported of visceral leishmaniasis (1985-1990). *Bull Soc Pathol Exot* 1990 1992;85(4):296-301.
 20. Marty P. Visceral leishmaniases: epidemiology and diagnosis. *Med Mal Infect* 2005;35 Suppl 2:S72-73.
 21. Essabbah Aguir N, Toumi A, Loussaïf C, Gorcii M, M'rad S, Ben Brahim H et al. La leishmaniose viscérale de l'adulte immunocompétent : à propos de six cas. *Pathologie Biologie*.2013;61 (2):54-58.
 22. Aoun K, Kooli C, Bouratbine A, Ben Romdhane N, Kaaroud H, Ben Maïz H, et al. Aspects épidémiologiques et cliniques de la leishmaniose viscérale de l'adulte en Tunisie. *Med Mal Infect* 2002;32(7):387-92.
 23. Aoun K, Kaaroud H, Hamzaoui S, Siala E, Kooli C, Turki S, et al. Particularities of visceral leishmaniasis in adults not infected by HIV in Tunisia. *Med Trop* 2004;64(2):160-2.
 24. Dedet J-P, Carme B, Desbois N, Bourdoiseau G, Lachaud L, Pratlong F. Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. *Presse Med* 2013;42(11):1469-81.
 25. Marty P, Delaunay P, Fissore C, Le Fichoux Y. Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. Update on the utility of the IT-Leish and ID-Pagia leishmaniasis tests. *Med Trop* 2007;67(1):79-85.
 26. Lachaud L, Dedet JP, Marty P, Faraut F, Buffet P, Gangneux JP, et al. Surveillance of leishmaniases in France, 1999 to 2012. *Euro Surveill* 2013;18:20534.
 27. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012;7(5):e35671.
 28. Abdalmaula GH, Barbadoro P, Marigliano A, Illuminati D, Di Stanislao F, D'Errico MM, et al. Human visceral leishmaniasis: a picture from Italy. *J Infect Public Health* 2013;6(6):465-72.
 29. Bourdoiseau G. Le vétérinaire acteur de santé publique : exemple de la leishmaniose canine, zoonose vectorielle. *Bull Académie Natl Médecine* 2015;199(6):909-20.
 30. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet Lond Engl* 2005;366(9496):1561-77.
 31. Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jiménez M, et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 2008;48(7):1383-9.
 32. Kallel K, Ammari L, Kaouech E, Belhadj S, Anane S, Kilani B, et al. Portage asymptomatique de *Leishmania infantum* chez des malades tunisiens infectés par le VIH. *Pathologie Biologie* 2007;55(10):521-4.
 33. Louzir H, Dellagi K. Les leishmanioses: un modèle d'étude des interactions hôte-parasite; implications pour la maladie humaine. *Ann Inst Pasteur Actual* 1999;10:67-80.
 34. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27(5):305-18.
 35. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect* 2014;69 Suppl 1:S10-18.

36. Zayet S, Abdelmalek R, Ben Romdhane N, Sahli H, Aoun K, Tiouiri Benaissa H. Isolated cervical lymphadenopathy: Do not forget atypical leishmaniasis. *Presse Med* 2017;46(4):452-4.
37. Zougaghi L, Moutaj R, Chabaa L, Agoumi A. Infantile visceral Leishmaniasis: epidemiological, clinical and biological characteristics. About 93 case reports in the children hospital of Rabat. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr* 2009;16(11):1513-8.
38. Aoun K, Kalboussi Y, Ben Sghaier I, Souissi O, Hammami H, Bellali H, et al. Assessment of incubation period of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Tunisia. *Am J Trop Med Hyg* 2020;103(5):1934-7.
39. Deniau M, Cañavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;97 Suppl 1:115-33.
40. Aissi W, Ben Hellel K, Habboul Z, Ben Sghaier I, Harrat Z, Bouratbine A, et al. Profils épidémiologique, clinique et biologique de la leishmaniose viscérale infantile à l'hôpital de Kairouan (Tunisie) : à propos de 240 cas. *Bull Soc Pathol Exot* 2015;108(4):265-71.
41. Rosenthal E, Marty P, del Giudice P, Pradier C, Ceppi C, Gastaut JA, et al. HIV and *Leishmania* coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of *Leishmania*. *Clin Infect Dis* 2000;31:1093-5.
42. Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86(5):505-7.
43. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011;105(1):1-6.
44. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007;5(11):873-82.
45. Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis* 2016;53(1):8-16.
46. Sarkari B, Rezaei Z, Mohebbi M. Immunodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Current Status and Challenges: A Review Article. *Iran J Parasitol* 2018;13(3):331-41.
47. Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res* 2012;110(3):1065-78.
48. Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 2014;8(8):961-72.
49. Izri MA, Deniau M, Brière C, Rivollet D, Petithory JC, Houin R, et al. Leishmaniasis in AIDS patients: results of leukocytoconcentration, a fast biological method of diagnosis. *Bull World Health Organ* 1996;74(1):91-3.
50. Diro E, Yansouni CP, Takele Y, Mengesha B, Lynen L, Hailu A, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood microscopy in Ethiopia: A Prospective Phase III study of the diagnostic performance of different concentration techniques compared to tissue aspiration. *Am J Trop Med Hyg* 2017;96(1):190-6.
51. Chemli J, Abroug M, Fathallah A, Abroug S, Ben Said M, Harbi A. Contribution of leucoconcentration in the diagnosis of Kala-azar in Tunisia. *Med Mal Infect* 2006;36(7):390-2.
52. Chouih E, Amri F, Bouslimi N, Siala E, Selmi K, Zallagua N, et al. Cultures on NNN medium for the diagnosis of leishmaniasis. *Pathol Biol* 2009;57(3):219-24.
53. Belhadj S, el Houda Toumi N, Kallel K, Dakhliya H, Pralong F, Boussem N, et al. Visceral leishmaniasis in immunocompetent children: diagnostic and epidemiologic value of peripheral *Leishmania* blood culture. *Tunis Med* 2001;79(4):231-3.
54. Aoun K, Bouratbine A, Harrat Z, Belkaïd M, Bel Hadj Ali S. Particular profile of the zymodemes of *Leishmania infantum* causing visceral leishmaniasis in Tunisia. *Bull Soc Pathol Exot* 2001;94(5):375-7.
55. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pralong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990;65(3):111-25.
56. Carrió J, Portús M. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol* 2002;2:11.
57. Belhadj S, Hicheri-Helali J, Kallel K, Kaouech E, Abaza H, Toumi NEH, et al. Place de la culture dans le diagnostic parasitologique des leishmanioses viscérales et cutanées: Expérience tunisienne. *Rev Fr Lab* 2005;369:41-5.
58. Belhadj S, Toumi NH, Dakhliya H, Kallel K, Boussem N, Ben Chaabane T, et al. Peripheral blood culture as a diagnostic modality for visceral leishmaniasis: apropos of 61 cases. *Med Trop* 2002;62(2):155-7.
59. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(5):951-8.
60. Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F, El Safi SH, Hailu A, Mondal D, et al. Evaluation of rapid diagnostic tests:

- visceral leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology* 2007;5(11):S31-9.
61. Badaró R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35(1):72-8.
 62. Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8(6):1220-4.
 63. Maia Z, Lirio M, Mistro S, Mendes CMC, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(1):e1484.
 64. Salotra P, Sreenivas G, Nasim AA, Subba Raju BV, Ramesh V. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis with Crude or Recombinant k39 Antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(2):370-3.
 65. Vaish M, Bhatia A, Reed SG, Chakravarty J, Sundar S. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(1):81-5.
 66. Atta AM, D'Oliveira null, Correa J, Atta ML, Almeida RP, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59(3):426-30.
 67. Saghrouni F, Gaïed-Meksi S, Fathallah A, Amri F, Ach H, Guizani I, et al. Immunochromatographic rK39 strip test in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103(12):1273-8.
 68. Lévêque MF, Battery E, Delaunay P, Lmimouni BE, Aoun K, L'Ollivier C, et al. Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2020;14(3):e0008139.
 69. Seyyedtabaei Sj, Rostami A, Haghighi A, Mohebalı M, Kazemi B, Fallahi S, et al. Detection of potentially diagnostic *Leishmania* Antigens with Western Blot analysis of sera from patients with cutaneous and visceral leishmaniasis. *Iran J Parasitol* 2017;12(2):206-14.
 70. Marty P, Lelièvre A, Quaranta JF, Suffia I, Eulalio M, Gari-Toussaint M, et al. Detection by Western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89(6):690-1.
 71. Fissore C, Delaunay P, Ferrua B, Rosenthal E, Del Giudice P, Aufeuvre J-P, et al. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42(11):5332-3.
 72. Saghrouni F, Khammari I, Kaabia N, Bouguila J, Ben Abdeljelil J, Fathallah A, et al. Asymptomatic carriage of *Leishmania* in family members of patients with visceral leishmaniasis in Central Tunisia. *Pathol Biol* 2012;60(5):e55-58.
 73. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(5):e1665.
 74. Mohebalı M, Keshavarz H, Shirmohammad S, Akhoundi B, Borjian A, Hassanpour G, et al. The diagnostic accuracy of direct agglutination test for serodiagnosis of human visceral leishmaniasis: a systematic review with meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2020;20(1):946.
 75. 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.
 76. Bangert M, Flores-Chávez MD, Llanes-Acevedo IP, Arcones C, Chicharro C, García E, et al. Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12(3):e0006277.
 77. Kohanteb J, Ardehali S. Cross-reaction of sera from patients with various infectious diseases with *Leishmania infantum*. *Med Princ Pract* 2005;14(2):79-82.
 78. Maia Z, Lirio M, Mistro S, Mendes CMC, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(1):e1484.
 79. Akhoundi B, Mohebalı M, Babakhan L, Edrissian G-H, Eslami M-B, Keshavarz H, et al. Rapid detection of human *Leishmania infantum* infection: a comparative field study using the fast agglutination screening test and the direct agglutination test. *Travel Med Infect Dis* 2010;8(5):305-10.
 80. Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 2010;4(2):114-7.
 81. Farahmand M, Khalaj V, Mohebalı M, Khalili G, Naderi S, Ghaffarinejad P, et al. Comparison of recombinant A2-ELISA with rKE16 dipstick and direct agglutination tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in dogs in Northwestern Iran. *Rev Soc Bras*

- Med Trop 2015;48(2):188-93.
82. Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EA, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop Med Int Health* 2001;6(2):108-13.
 83. Bhattacharyya T, Boelaert M, Miles MA. Comparison of visceral leishmaniasis diagnostic antigens in African and Asian *Leishmania donovani* reveals extensive diversity and region-specific polymorphisms. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(2):e2057.
 84. Abass E, Bollig N, Reinhard K, Camara B, Mansour D, Visekruna A, et al. rKLO8, a novel *Leishmania donovani* - derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(7):e2322.
 85. Van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infect Dis Clin North Am* 2019;33(1):79-99.
 86. Cunningham J, Hasker E, Das P, El Safi S, Goto H, Mondal D, et al. A Global comparative evaluation of commercial Immunochromatographic Rapid Diagnostic Tests for visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2012;55(10):1312-9.
 87. Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;(6):CD009135.
 88. Mukhtar M, Abdoun A, Ahmed AE, Ghalib H, Reed SG, Boelaert M, et al. Diagnostic accuracy of rK28-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis: a prospective clinical cohort study in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2015;109(9):594-600.
 89. De Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RCS, Pessoa-E-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque S da C, Tavares D de HC, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci* 2015;5:31.
 90. Cota GF, de Sousa MR, de Freitas Nogueira BM, Gomes LI, Oliveira E, Assis TSM, et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. *Am J Trop Med Hyg* 2013;89(3):570-7.
 91. Sundar S, Maurya R, Singh RK, Bharti K, Chakravarty J, Parekh A, et al. Rapid, non invasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody. *J Clin Microbiol* 2006;44(1):251-3.
 92. Singh S, Kumari V, Singh N. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(3):568-72.
 93. Sinha PK, Bimal S, Pandey K, Singh SK, Ranjan A, Kumar N, et al. A community-based, comparative evaluation of direct agglutination and rK39 strip tests in the early detection of subclinical *Leishmania donovani* infection. *Ann Trop Med Parasitol* 2008;102(2):119-25.
 94. Schallig HDFH, Canto-Cavalheiro M, da Silva ES. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo* 2002;97(7):1015-8.
 95. Romero GAS, de la Glória Orge Orge M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macêdo V, de Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 2005;93(1):49-56.
 96. Kohanteb J, Ardehali S. Cross-reaction of sera from patients with various infectious diseases with *Leishmania infantum*. *Med Princ Pract* 2005;14(2):79-82.
 97. De Ruiter CM, van der Veer C, Leeflang MMG, Deborggraeve S, Lucas C, Adams ER. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *J Clin Microbiol* 2014;52(9):3147-55.
 98. Singh OP, Hasker E, Sacks D, Boelaert M, Sundar S. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. *Clin Infect Dis* 2014;58(10):1424-9.
 99. Gidwani K, Picado A, Ostyn B, Singh SP, Kumar R, Khanal B, et al. Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18(2):346-8.
 100. Hommel M, Sarkari B, Carney J, Chance ML. Katex for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Med Trop* 2001;61(6):503-5.
 101. Ben-Abid M, Galaï Y, Habboul Z, Ben-Abdelaziz R, Ben-Sghaier I, Aoun K, et al. Diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis by detection of *Leishmania* -related antigen in urine and oral fluid samples. *Acta Tropica* 2017;167:71-2.
 102. Ghosh P, Bhaskar KRH, Hossain F, Khan MAA, Vallur AC, Duthie MS, et al. Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2016;9(1):383.

103. Vallur AC, Tutterrow YL, Mohamath R, Patabhi S, Hailu A, Abdoun AO, et al. Development and comparative evaluation of two antigen detection tests for Visceral Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 2015;15:384.
104. Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;98(2):102-10.
105. García-García JA, Martín-Sánchez J, Gállego M, Rivero-Román A, Camacho A, Riera C, et al. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 2006;44(12):4455-8.
106. Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 2006;123(3):357-88.
107. Sundar S, Singh OP. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Mol Diagn Ther* 2018;22(4):443-57.
108. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2018;11(1):273.
109. Kaouech E, Kallel K, Toumi NH, Belhadj S, Anane S, Babba H, et al. Pediatric visceral leishmaniasis diagnosis in Tunisia: Comparative study between optimized PCR assays and parasitological methods. *Parasite* 2008;15:143-50.
110. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004;42(11):5249-55.
111. Mary C, Faraut F, Drogoul M-P, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75(5):858-63.
112. Aoun K, Chouih E, Amri F, Ben Alaya N, Raies A, Mary C, et al. Short report: Contribution of quantitative real-time polymerase chain reaction to follow-up of visceral leishmaniasis patients treated with meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81(6):1004-6.
113. Sudarshan M, Sundar S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;80(1):40-2.
114. Chaouch M, Aoun K, Ben Othman S, Ben Abid M, Ben Sghaier I, Bouratbine A, et al. Development and assessment of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* specific Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Am J Trop Med Hyg* 2019;101(1):101-7.
115. Verma S, Avishek K, Sharma V, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75(4):390-5.
116. Bousslimi N, Ben Abda I, Ben Mously R, Siala E, Harrat Z, Zallagua N, et al. Place de l'identification des leishmanies par la polymérase chain reaction – restriction fragment length polymérase dans l'étude de l'épidémiologie des leishmanioses cutanées en Tunisie. *Pathol Biol* 2014;62(1):30-3.
117. Castelli G, Bruno F, Caputo V, Fiorella S, Sammarco I, Lupo T, et al. Genetic tools discriminate strains of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs in Sicily, Italy. *PLoS Negl Trop Dis* 2020;14(7):e0008465.
118. Dereure J, El-Safi SH, Bucheton B, Boni M, Kheir MM, Davoust B, et al. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. *Microbes Infect* 2003;5(12):1103-8.